

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER
SPEZIFISCHEN RADIOAKTIVITÄT DER DNS IN HEFEZELLEN
UND IHRE ANWENDUNG AUF RÖNTGENBESTRAHLTE KULTUREN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Yamaguchi - Koll

aus Aachen

1972

Hamburg 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550808_0063

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER
SPEZIFISCHEN RADIOAKTIVITÄT DER DNS IN HEFEZELLEN
UND IHRE ANWENDUNG AUF RÖNTGENBESTRAHLTE KULTUREN

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Ursula YAMAGUCHI-KOLL

aus Aachen



Referent: Professor Lochmann

Korreferent: Professor Hilz

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 11 1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
EXPERIMENTELLER TEIL	3
ERGEBNISSE	9
1. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität in der DNS	9
1.1 Erfassung des DNS-Gehaltes	9
1.2 Selektive Erfassung der Radioaktivität in der DNS	19
2. Aufnahme und Einbau von Adenosin in logarithmisch wachsende Hefezellen	30
3. In-vivo-Bestimmungen von Reparaturvorgängen an der DNS nach Röntgenbestrahlung	39
3.1 Zellwachstum nach Bestrahlung	40
3.2 DNS-Synthese nach Bestrahlung	41
3.3 Spezifische Radioaktivität der DNS während der Inkubation von bestrahlten, radioaktiv markierten Hefezellen	43
DISKUSSION	50
ZUSAMMENFASSUNG	57
LITERATURVERZEICHNIS	59

EINLEITUNG

Die Bestimmung dynamischer Parameter der Hefe-DNS wie Replikation oder Reparatur - bei den meisten Zellen mit Hilfe von markiertem Thymin oder Thymidin relativ einfach zu lösen - stößt bei Hefezellen auf große Schwierigkeiten, da hier eine spezifische radioaktive Markierung der DNS mittels exogen angebotenen Thymins oder Thymidins nicht möglich ist. Hefen und auch andere Mikroorganismen besitzen offensichtlich keine Thymidin-Kinase. Das angebotene Thymidin wird zu Thymin degradiert und über den Pyrimidinsalvage-pathway als Cytosin, Uracil und Thymin sowohl in die DNS als auch in die RNS eingebaut (GRIVELL und JACKSON¹⁹; WILLIAMS und MITCHELL⁷⁸). Außerdem werden Thymin-Verbindungen nur schlecht oder überhaupt nicht in die Hefezellen aufgenommen (LOCHMANN⁴⁵; JANNSEN et al³⁴). Das ist eventuell auf Effekte in der Zellwand zurückzuführen (WILLIAMSON⁷⁴). Eine Ausnahme bildet das TMP, das in beschränktem Umfang aufgenommen und speziell in die DNS eingebaut wird (JANNSEN et al³⁴). Für unsere Zwecke war die so zu erzielende spezifische Radioaktivität jedoch zu gering.

Man ist also auf die Verwendung von unspezifischen Präkursoren angewiesen. Um dabei die gleichen Aussagen machen zu können wie bei DNS-spezifischer radioaktiver Markierung, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

- a) eine genaue chemische Nachweismethode zur quantitativen Bestimmung der DNS in den Zellen,
- b) die Möglichkeit einer spezifischen Erfassung der Radioaktivität in der DNS.

Mit Hilfe einer Methode, die diesen Voraussetzungen entspricht, ist es dann möglich, Vorgänge wie Synthese oder Repair zu verfolgen, auch wenn keine spezifische radioaktive Markierung durch Einbau von Thymin in die DNS zu erreichen ist.

Diese Arbeit beschreibt die Markierung von Hefekulturen mit ^3H -Adenosin, die selektive Erfassung der DNS und ihrer spezifischen Radioaktivität sowie die Anwendung der Methode auf Probleme der DNS-Reparatur nach Röntgenbestrahlung.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Organismus

Die Versuche wurden mit einem Klon von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, der aus käuflicher triploider Presshefe ("Germania-Hefe", Norddeutsche Hefewerke GmbH) auf Nähragar isoliert worden war. Für manche der Vorversuche wurde auch direkt frische Presshefe verwendet.

2. Nährmedium

Als Nährmedium wurde das vollsynthetische von WICKERHAM⁷³, abgewandelt nach HILZ und ECKSTEIN²⁸, benutzt.

3. Kultur- und Wachstumsbedingungen

Die Hefezellen wurden aufbewahrt in sterilem Wasser bei 4°C. Bis zu einem Zeitraum von ca 14 Tagen blieben alle Zellen lebensfähig und nach Suspension in Nährmedium, bei 32°C, Belüftung mit steriler Luft und unter Rühren mit einem Magnetrührer begannen sie nach etwa 60 min. mit einer Generationszeit von ca 100 min. asynchron zu wachsen. Bei den Abnahmen wurde der Kultur ein definiertes Volumen entnommen, im Eisbad gekühlt und in 15 min. bei 6000 g und 4°C abzentrifugiert.

4. Kultivierung auf Nähragar

Die Zellen werden mit einer autoklavierten, gerade noch flüssigen Lösung von 1% Agar-Agar in WM in Petrischalen suspendiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Dann können die Zellkolonien ausgewertet werden.

5. Synchronisation

Bei den Versuchen mit synchronisierter Hefe wurden die Zellen vor der Inkubation unter Wachstumsbedingungen nach dem Verfahren von HILZ und ECKSTEIN²⁸ synchronisiert.

6. Wachstumskontrolle

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte durch Auszählung unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer nach THOMA.

7. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlungen wurden mit einem Gerät des Institutes für Biophysik der Universität Hamburg, Typ RT 200 der Firma C.F. MUELLER, Hamburg, durchgeführt. Mit dem FRICKE-Dosimeter wurden bei 20 mA, 200 kV, Filter 2 mm Al (Eigenfilter) und einem Abstand von 20 cm bei einer Schichtdicke von 5 mm der bestrahlten Lösung eine absorbierte Dosis von 1680 r/min gemessen. Die Hefezellen wurden in Nährmedium suspendiert und im Eisbad unter Rühren bestrahlt.

8. Reagentien

Als Standard-DNS bei den DNS-Bestimmungen wurde Lachsperma-DNS der Firma SERVA verwendet.

Die DNase-Behandlungen wurden mit RNase-freiem Enzympräparat der Firma MERCK, Darmstadt, durchgeführt.

Der Ansatz für die DNase-Behandlung enthält 0,15 M Tris-Puffer pH 7,3; 5×10^{-3} M MgSO_4 und 30 μg DNase bei einem Endvolumen von 0,4 ml. Der Stop der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 0,2 ml 6% PCS.

DPA-Reagenz nach DISCHE¹⁰: 90 ml Eisessig + 0,9 g DPA + 2,5 ml H_2SO_4 .

DPA-Reagenz nach BURTON⁶: 100 ml Eisessig + 1,5 g DPA + 1,5 ml H_2SO_4 . Unmittelbar vor dem Reaktionsansatz wird 1,6%iger Acetaldehyd zugegeben in einer Konzentration von 0,1 ml/20 ml Reagenz. Die Proben enthielten vor Zugabe des Reagenzes 0,1 Vol. 30 %iger PCS.

Die RNS wurde mit Hilfe der Orcinol-Reaktion nach LUSENA⁴⁶ bestimmt. Das Orcinol-Reagenz enthält 0,5 g Orcin und 0,25 g FeCl_3 in 50 ml HCl conc. Gleiche Teile RNS-Hydrolysat und Reagenz werden 30 min bei 90°C im Wasserbad gehalten und der entstehende Farbkomplex bei 660 nm gemessen.

Radioaktive Substanzen:

Zur radioaktiven Markierung wurde Adenosin- H^3 (G) 10,5 Ci/mmol, 1mCi/ml, The Radiochemical Centre Amersham, verwendet.

9. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde durch Flüssigkeitsscintillationsmessung bestimmt. Die Scintillatorflüssigkeit enthält 7 g PPO (2,5-Diphenyl-oxazol) pro l und 0,3 g POPOP (1,4-bis-2-(5-phenyloxazol)-Benzen) pro l in Naphtalin. Bei der Zählhausbeute ergab sich ein starker "Quench" in Messproben von Säurehydrolysaten durch Perchlorsäure (Tab. 1 und Abb. 1). Deshalb wurden alle Messproben standardisiert bei einer Konzentration von 2 % PCS gemessen.

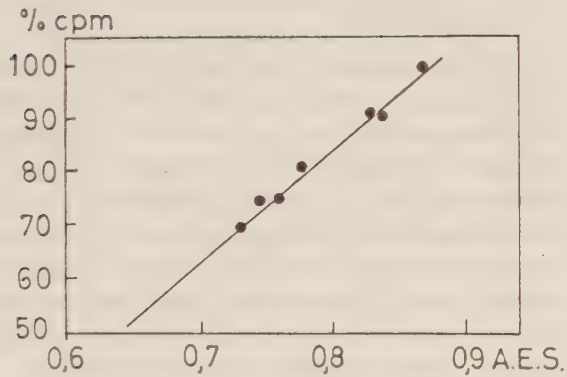


Abb. 1: Zählausbeuten an cpm bei unterschiedlichem Quench. Zu Meßproben mit unterschiedlichem A.E.S.-Wert wurden je 10 μ l $^3\text{H-H}_2\text{O}$ ($1,183 \times 10^3 \text{ dpm/l}$) gegeben und die cpm gemessen. Die Zählausbeute in reinem Wasser wurde gleich 100 % gesetzt.

Tab. 1: Zählausbeute von 1 nCi ^3H -Adenosin bei verschiedenen Säurekonzentrationen.

Ausbeute an cpm	cpm	Säure	A.E.S.	Ausbeute nach Abb.1
91 %	550	5 % TCE	0,83	91 %
54 %	325	2 % PCS	0,65	54 %
33 %	200	4 % PCS	0,55	33 %

1 nCi ^3H -Adenosin in wässriger Lösung wurde gemessen bei verschiedenen Säurekonzentrationen. PCS hat im Vergleich zu TCE einen sehr hohen Quench.

10. Versuchsanordnung zur Messung des Einbaues von Adenosin

Die Zellen werden über Nacht in einer Suspensionskultur vorkultiviert. Für den radioaktiven Ansatz werden sie mit frischem Medium auf den Standardansatz von 8×10^9 Zellen/l verdünnt und ^3H -Adenosin in der Standardkonzentration von $400 \mu\text{Ci/l}$ zugegeben. Nach ca 120 min unter Wachstumsbedingungen, spätestens nach einer Zellverdopplung, wird die Kultur abgebrochen, indem die Zellen bei 4°C in 10 min. abzentrifugiert und bei einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in WM suspendiert, bei 4°C über Nacht aufbewahrt werden.

11. Versuchsablauf zur Messung der spezifischen Aktivität nach Bestrahlung

Die Hälfte der radioaktiv markierten Zellen werden unter den beschriebenen Bedingungen mit der Röntgenröhre bestrahlt und anschließend Kontroll- und behandelte Zellen jeweils mit Medium auf ca 8×10^9 Zellen/l verdünnt und unter Wachstumsbedingungen kultiviert.

12. Bestimmung von Radioaktivität und DNS-Gehalt bzw.

A_{260} in den 3 Fraktionen: Homogenat, Alkali-Extrakt und durch DNase abgebaute DNS

Zu den verschiedenen Zeiten werden der Kultur definierte Volumina Zellsuspension entnommen, ihre Zellzahl bestimmt und abzentrifugiert. Die Zellen werden 1 mal mit ca 15 ml H_2O gewaschen, dann mit 2 ml H_2O suspendiert und durch Erhitzen in 10 min. im kochenden Wasserbad aufgeschlossen. Das Volumen dieses ersten Homogenates wird bestimmt. Es schwankt je nach Zellzahl zwischen 2,5 und

5 ml. In einem Aliquot mit ca 2×10^8 Zellen werden DNS-Gehalt, säurefällbare Radioaktivität und in der säurelöslichen Zellfraktion die spezifische Radioaktivität, bezogen auf A_{260} , bestimmt. Das übrige Homogenat wird 20 Std. bei 37°C mit 1 N KOH extrahiert. Aus dem Alkali-Extrakt wird, wie in Kap. 1,2 beschrieben, die säureunlösliche Fraktion mit 5 % TCE ausgefällt, der Niederschlag mit 2 % PCS gewaschen, mit NaOH und Trispuffer gelöst und neutralisiert und mit DNase inkubiert, wie oben beschrieben. In einem Aliquot des Alkali-Extraktes aus ca 2×10^8 Zellen werden DNS-Gehalt und Radioaktivität bestimmt. Nach der DNase-Behandlung wird die spezifische Radioaktivität der säurelöslich gewordenen DNS-Bruchstücke durch Messung von A_{260} und cpm bestimmt.

Abkürzungen:

DPA Diphenylamin
PCS Perchlorsäure
TCE Trichloressigsäure
RT Raumtemperatur
WM Wachstumsmedium (=Nährmedium)
Z Zellen

ERGEBNISSE

1. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität in der DNS

1.1 Erfassung des DNS-Gehaltes

Aufschluß der Zellen

Die Zellwände der Hefen sind sehr schwer angreifbar und osmotisch unempfindlich. Die schonendste Aufschlußmethode ist der enzymatische Abbau der Zellwand zur Bildung von Spheroblasten z.B. mit Strepzym (EDDY und WILLIAMSON⁷⁹), mit Glusulase (GIMMLER und SCHWEIZER⁸⁰), oder aber mit "Suc D'Helix Pomatia", Industrie Biologique Francaise, was nur eine Behandlung von ca 10 min. bei 30°C zum vollständigen Aufschluß von logarithmisch wachsenden Zellen erfordert (SCHNEIDER⁸³). Doch auch hier ist ein schneller Stop aller Stoffwechselprozesse nicht möglich. Eine andere, oft verwendete Methode ist der Aufschluß durch mechanisches Homogenisieren mit Glasperlen in einem MSK Homogenisator (BRAUN, Melsungen), die sich aber bei vielen Proben und bei geringen Mengen an Zellmaterial technisch als sehr aufwendig erwies und deshalb für unsere Fragestellung nicht anwendbar ist.

Eine Zellextraktion nach OGUR und ROSEN⁵³ konnte deshalb nicht vorgenommen werden, weil dabei sehr leicht in der DNS Apurinsäure entstehen kann durch Hydrolyse der Purinbasen. Das geschieht in der DNS etwa 650 x leichter als in der RNS (POHLMANN und SCHRAMM⁵⁷). Dadurch würde dann unter unseren Bedingungen ein Teil der in Form von Adenosin eingebauten Radioaktivität verloren gehen. Außerdem wird die DNS an den apurini-

sierten Stellen alkalilabil und dadurch im Alkali-Extrakt säurelöslich.

Der Aufschluß durch Erhitzen auf 100°C im Wasserbad erwies sich in vieler Hinsicht als vorteilhaft. Es können beliebig viele Proben und geringe Mengen an Zellmaterial ohne Verluste verarbeitet werden, und es ist ein sehr schneller Stop aller Wachstums- und Stoffwechselvorgänge möglich, ohne daß eine Säurefällung erforderlich ist.

Das Erhitzen geht bei einem Volumen der Suspension von 3 ml sehr schnell, nach 30 sec. hat die Zellsuspension mehr als 70°C (Abb. 2). Ein Vergleich mit TCE-extrahierten Zellen zeigt, daß nach Erhitzen nicht weniger DNS gefunden wird und auch die Ausbeute an DNS nach Alkali-Extraktion nicht schlechter ist, als mit Hilfe der anderen Methoden (Tab. 2).

Beim Aufschluß durch Erhitzen werden offensichtlich die Zellwände zum Platzen gebracht. Unterm Mikroskop sehen die Zellen eckig aus und haben keine gebogenen Zellwandstücke mehr, sondern gerade Kanten.

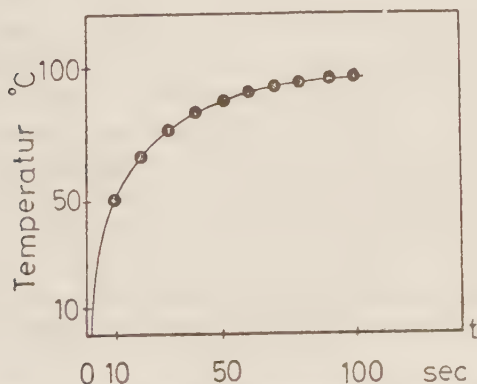


Abb. 2: Temperatur der Zellsuspension beim Erhitzen im kochenden Wasserbad.

	$\mu\text{g DNS}/10^9 \text{ Zellen}$		
	TCE-Extraktion	Glasperlen	Erhitzen
Homogenat	175	161	167
Alkali-Extrakt	117	120	139
Ausbeute im Alkali-Extrakt	62 %	75 %	81 %

Tab. 2: Ausbeute an DNS nach verschiedenen Zellaufschlußmethoden.

Die Zellen wurden nach den verschiedenen Methoden aufgeschlossen und jeweils in der säureunlöslichen Fraktion nach Hydrolyse mit TCE die DNS mit Hilfe der DPA-Reaktion nach BURTON bestimmt.

Säure-Extraktion

Zur DNS-Bestimmung im erhitzten Zellhomogenat und im Alkali-Extrakt wird das säureunlösliche Material nach dem Aufschluß der Zellen mit TCE oder PCS gefällt. Die Extraktion des Niederschlages mit kalter Säure und wiederholtes Waschen mit Äthanol und Äther erwiesen sich als überflüssig, da keine Phosphatbestimmungen vorgenommen wurden und die DNS-Bestimmung durch eventuell anwesende Lipidreste unbeeinflusst war. Der Niederschlag wird heiß mit TCE extrahiert nach SCHNEIDER⁶. Die optimale Farbreaktion wird nach einer Extraktionsdauer von etwa 20 min. bei 90°C und 5 % TCE erreicht (Abb. 3). Unter diesen Bedingungen verläuft die Säure-Extraktion linear mit der eingesetzten Hefemenge (Abb. 4). Als Vergleich wurde Lachssperma-DNS, die unter den hier

optimalen Bedingungen 10 min. bei 80°C und 2 % PCS hydrolysiert worden war, als Standard verwendet. Zwischen 5 % TCE und 2 % PCS besteht kein Unterschied hinsichtlich der Extraktion. Bei 5 % PCS und 70°C betragen nach 20 min. die Degradierungen an der Desoxyribose 5 % (MEIJIS und SCHILPERPOORT⁵⁰). Es wurde später immer 2 % PCS für die Extraktion verwendet, weil sie wegen der relativ niedrigen Eigenabsorption bei 260 nm zur Säurefällung nach der DNase-Behandlung erforderlich war, andererseits aber einen starken Quencheffekt bei der Messung der Radioaktivität mit Flüssigkeitsscintillator zeigte, so daß alle Fraktionen unter standardisierten Bedingungen gemessen wurden (siehe "Methodik").

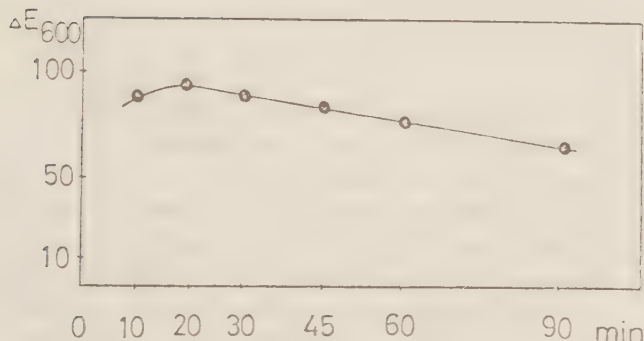


Abb. 3: Kinetik der Säureextraktion

2 ml Zellhomogenat von 1×10^9 Zellen wurden mit 2 ml 5 %iger TCE bei 90°C extrahiert.

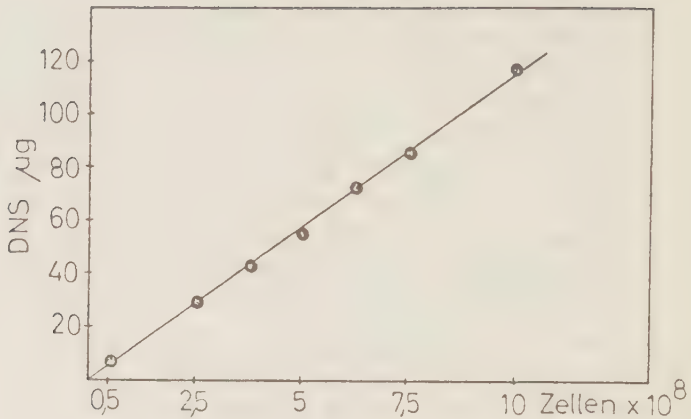


Abb. 4: Abhängigkeit der Säureextraktion von der eingesetzten Hefemenge.

Verschiedene Mengen von Zellhomogenat werden mit 10% TCE ausgefällt und der Rückstand mit 2 ml 5 % TCE bei 90°C 20 min. extrahiert.

DNS-Bestimmung mit Hilfe der DPA-Reaktion

Der chemische Nachweis von DNS mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion mit Desoxyribose wird erschwert durch unspezifische Zuckerreaktionen mit Glykogen und anderen Polysacchariden (77,4,31). In Hefezellen treten bei der DPA-Reaktion nach DISCHE¹⁰ mit Eisessig, H₂SO₄, DPA bei 100°C unspezifische Reaktionen auf mit Stoffen, die durch Säure- und durch Alkalihydrolyse freigesetzt wurden. Mit zunehmender Zeit der Reaktion bei 100°C entsteht immer mehr "DPA-positives Material" (Abb. 5) und bei der Alkali-Extraktion der Zellen mit KOH findet man "DPA-positives Material" in allen drei Fraktionen:

Im unlöslichen Zellrückstand, in der säure-unlöslichen und in der säure-löslichen Fraktion des Alkali-Extraktes (Tab. 3). Außerdem stimmt das Absorptionsspektrum des entstehenden Farbkomplexes nicht mit dem von reiner DNS überein (Abb. 6). Diese Störungen sind wohl auf den hohen Polysaccharid-Anteil der Hefezellwand zurückzuführen.

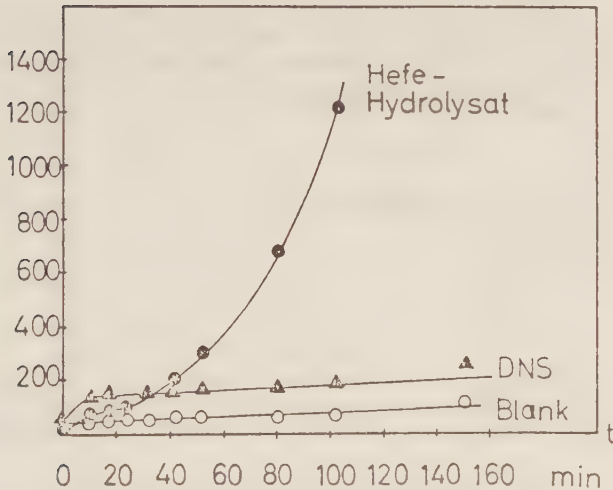


Abb. 5: Kinetik der DPA-Reaktion nach DISCHE

Je 2 ml Hefehydrolysat, gewonnen aus je 2×10^8 Zellen nach Säurefällung durch 10 min. Hydrolyse mit 10 % TCE bei 90°C, werden mit DPA-Reagenz nach DISCHE (s. Methodik, 8) bei 100°C im kochenden Wasserbad inkubiert. Die DNS ist Lachssperma-DNS, 50 µg/ml, die 20 min. bei 90°C mit 5 % TCE hydrolysiert wurde. Der Blank enthält 2 ml 5 % TCE und 4 ml DPA-Reagenz.

Std.	Alkali-unlöslich	Alkali-löslich-Säure-unlöslich	Alkali-löslich-Säure-löslich
1	50 %	17 %	33 %
8	33 %	28 %	40 %

Tab. 3: Verteilung von "DPA-positivem Material" nach Lauge-Extraktion.

1×10^9 Zellen werden mit je 2 ml 1 N KOH bei 37°C extrahiert. Nach der Extraktionszeit werden die unlöslichen Zellrückstände abzentrifugiert und im Überstand durch Säurefällung eine alkalilösliche, Säure-unlösliche und eine alkalilösliche Säure-lösliche Fraktion gebildet. In allen drei erhaltenen Fraktionen wird nach Säurehydrolyse die DPA-Reaktion nach DISCHE durchgeführt.

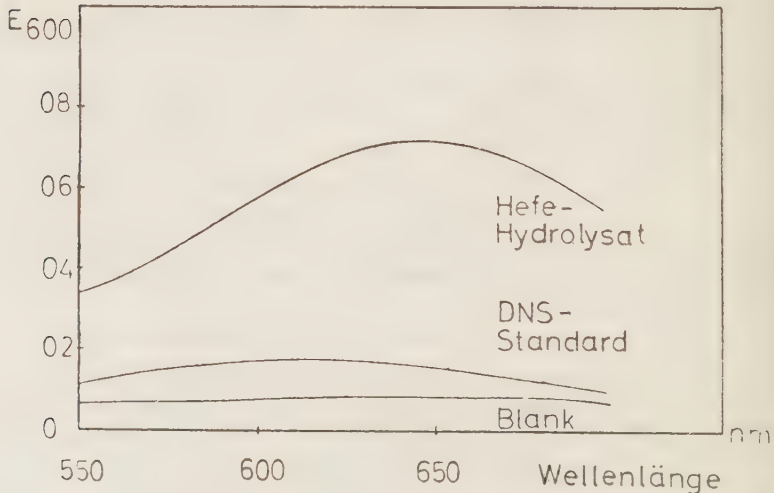


Abb. 6: Absorptionspektrum des DPA-Farbkomplexes

Die Absorptionspektren des DPA-Farbkomplexes von Hefe-Hydrolysat, Standard-DNS und Blank (s. Abb. 5) wurden nach 60 min Reaktionszeit bei 100°C im Spektralphotometer gemessen.

Bei der Abwandlung der Reaktion nach BURTON⁶ durch Zusatz von Acetaldehyd und Reaktion bei Raumtemperatur werden diese Nebenreaktionen vermieden.

Die Intensität der entstehenden Farbe nimmt bei verlängerter Reaktionszeit nicht mehr zu (Abb. 7) und das Absorptionsspektrum stimmt mit dem von Vergleichs-DNS überein (Abb. 8).

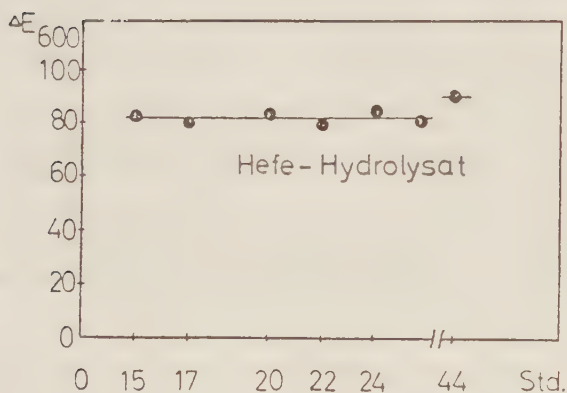


Abb. 7: Kinetik der DPA-Reaktion nach BURTON

Hefehydrolysat (s. Abb. 5) wurde mit DPA-Reagenz nach BURTON bei 30°C inkubiert (s. Methodik, 8). Die Entwicklung des Farbkomplexes ist nach 15 Std. abgeschlossen.

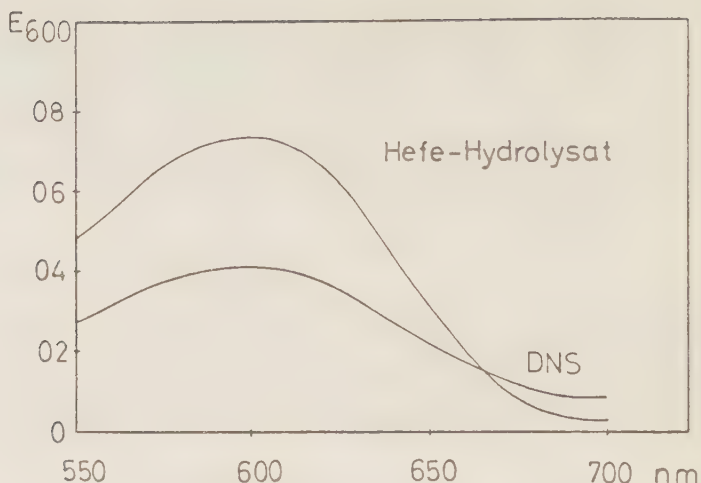


Abb. 8: Absorptionsspektrum des DPA-Farbkomplexes nach BURTON

Die Absorptionsspektren des DPA-Farbkomplexes nach BURTON (s. Methodik, 8) mit Hefehydrolysat (s. Abb. 5) und mit Standard-DNS, 60 µg/ml, hydrolysiert 20 min bei 90°C mit 10 % TCE, wurden nach 17 Std. Reaktionszeit bei 30°C im Spektralphotometer gemessen.

Die Reaktion verläuft linear zur eingesetzten Menge an Hefeextrakt, wenn eine Säurehydrolyse vorangeht (Abb. 9). Auf diese Weise ist es also möglich, die DNS im Zellhomogenat neben der RNS und neben dem übrigen Zellmaterial zu bestimmen. Bei reiner DNS läßt sich der DNS-Gehalt sehr einfach auch durch die Extinktion bei 260 nm messen.

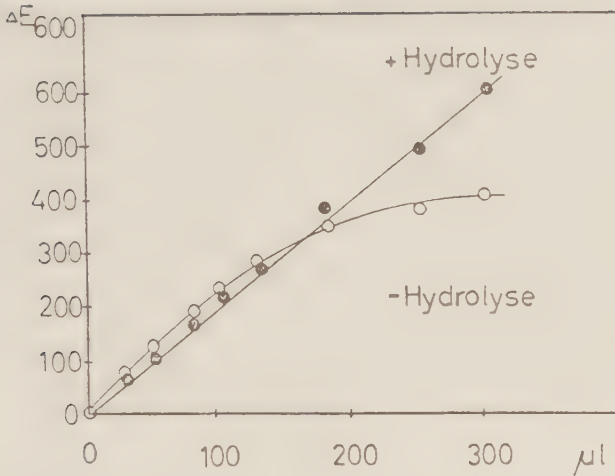


Abb. 9: Abhängigkeit der DPA-Reaktion von der eingesetzten Menge an Hefe-Extrakt.

Verschiedene Mengen Hefe-Extrakt (Alkali-Extrakt aus 1×10^9 Zellen, siehe Kapitel 1,2, mit TCE gefällt und mit PCS neutralisiert, Endvolumen 1 ml mit ca $100 \mu\text{g}$ DNS/ml) wurden in die DPA-Reaktion eingesetzt (s. Methodik, 8). Nach vorheriger Säurehydrolyse mit TCE verläuft die Reaktion linear mit der eingesetzten Menge. Ohne vorherige Hydrolyse ist die Farbentwicklung zunächst etwas intensiver, biegt aber bei höheren Mengen an Material schnell ab.

1.2 Spezifische Erfassung der Radioaktivität der DNS

Werden für Untersuchungen an der DNS unspezifische radioaktive Präkursoren verwendet, so ist eine vollkommene Abtrennung der DNS erforderlich. Bei Hefezellen ist das besonders schwierig, weil etwa 98 % der gesamten Nucleinsäuren RNS sind (LASEKOWSKI et al⁴³). Die bisher verwendeten Trennungsmethoden bestehen meistens in einer Präparation der Nucleinsäuren durch Äthanol-fällung oder Phenolextraktion und einer anschließenden Reinigung durch RNase-Behandlung und Chromatographie an Hydroxylapathit-Säulen (HANNSEN und LOCHMANN³⁵) oder durch Dichtegradientenzentrifugation mit CsCl nach MESELSON und STAHL⁵¹ (WILLIAMSON et al⁷⁶). Diese Methoden haben relativ geringe DNS-Ausbeuten und sind technisch sehr aufwendig, so daß sie schlecht für Serienversuche anwendbar sind.

Es ist in der Tat möglich, die DNS im Reagenzglas in kleinen Ansätzen aus einem Gemisch mit RNS und Proteinen abzutrennen durch spezifische Degradierung mit DNase. Dann lassen sich die entstehenden DNS-Bruchstücke durch eine Säurefällung vom übrigen hochmolekularen Material abtrennen und messen. Dabei ergeben sich mehrere Probleme:

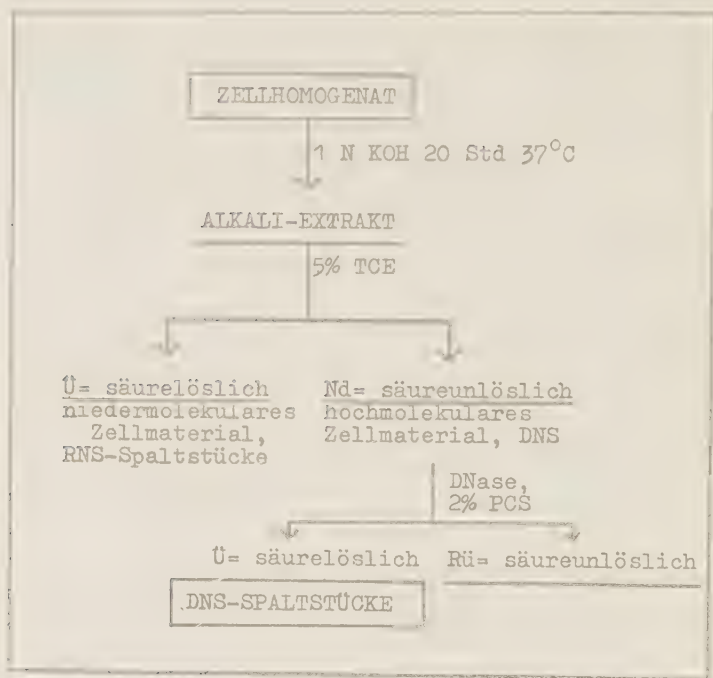
- a) Der hohe Background an Radioaktivität, bedingt durch den großen Anteil und die relativ starke radioaktive Markierung der RNS,
- b) das im Ansatz enthaltene Zellprotein kann inhibierend auf die DNase-Aktivität wirken,
- c) die eingesetzte DNase muß absolut frei sein von Fremd- insbesondere RNase-Aktivitäten,
- d) die Reaktion muß quantitativ sein und darf nicht selektiv nur bestimmte DNS-Fractionen erfassen.

Die Radioaktivität im Ansatz läßt sich durch vorangehende Alkali-Hydrolyse der RNS wesentlich reduzieren. Wir haben versucht, einen Teil des Proteins durch fraktionierte Fällung aus dem Alkali-Extrakt bei pH 5,0 abzutrennen. Da aber die Gefahr bestand, daß dabei ein Teil der DNS mitgefällt wurde, haben wir schließlich die DNase-Behandlung in Anwesenheit aller Proteine, die nach Alkali-Extraktion säurefällbar waren, durchgeführt, zumal es sich zeigte, daß auch unter diesen Bedingungen der DNase-Abbau quantitativ war (s. Kapitel 1,2).

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der DNS wurde also das Zellhomogenat in drei Schritten fraktioniert (Abb. 10):

- a) Alkali-Extraktion und gleichzeitig Hydrolyse des größten Teils der RNS,
- b) Säurefällung der hochmolekularen Fraktion mit der DNS aus dem Alkali-Extrakt und dadurch weitgehende Abtrennung der RNS-Abbauprodukte,
- c) DNase-Behandlung dieser säureunlöslichen Fraktion des Alkali-Extraktes. Dadurch wird nur die DNS säurelöslich und im Säureüberstand lassen sich dann Radioaktivität und A_{260} der DNS-Spaltstücke bestimmen.

Abb. 10: Spezifische Erfassung der DNS-Markierung



Alkali Extraktion

Das Zellhomogenat wird nach der Methode von SCHMIDT und TANNHAUSER⁶² 20 Std. bei 37°C mit 1 N KOH extrahiert. Die Zellrückstände werden 15 min. bei 6000 g abzentrifugiert, im Überstand, dem Alkali-Extrakt, befinden sich alle alkali-löslichen Zellkomponenten wie niedermolekulares Material, Proteine, RNS-Spaltstücke, DNS.

Säurefällung im Alkali-Extrakt

Der Alkali-Extrakt wird mit 6 N HCl neutralisiert, die säure-lösliche Fraktion mit 5 % TCE ausgefällt und zweimal mit 2 % PCS gewaschen. Im Niederschlag befinden sich die DNS und noch 3 % der Nucleinsäuren als RNS (Orcinol-Reaktion). Das bedeutet eine Reduzierung des RNS-Gehaltes um 99,94 %.

DNase-Behandlung

Die DNase-Behandlung wird mit RNase-freiem Enzym durchgeführt. Die Säureniederschläge des Alkali-Extraktes werden mit NaOH bei pH 9 in Lösung gebracht und mit 0,15 M Trispuffer, pH 7,0, neutralisiert. Die Lösung hat dann pH 7,3. Je Probe werden 2 Aliquots abgenommen. Ein Aliquot wird als Leerwert ohne DNase inkubiert. Die Inkubationsdauer beträgt 4 Std. bei 35°C. Der Stop der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 0,2 ml 6 %iger PCS. Die Säure-Endkonzentration ist dann 2 %. In den Leerwert wird die DNase nach der Säure zugegeben. Die Proben werden 10 min. bei 6000 Upm zentrifugiert und im Säure-Überstand der Gehalt an DNS-Spaltstücken durch Extinktionsmessung bei 260 nm und die Radioaktivität bestimmt. Als Vergleichsstandard dient Lachssperma-DNS, die 10 min bei 80°C mit 2 % PCS hydrolysiert wurde.

Obwohl im Alkali-Extrakt der größte Teil der RNS im Säure-Überstand bleibt, befindet sich im Niederschlag außer der DNS noch anderes radioaktives Material. Da bei Anwesenheit von ^3H -Adenosin besonders die RNS schneller markiert wird als die DNS, liegt die spezifische Radioaktivität (cpm/ μg DNS) einer so unreinen Fraktion höher als der tatsächlichen DNS-Markierung

entspricht (Abb. 11). Diese Verhältnisse können zu völlig falschen Schlüssen führen, wenn man nur den Werten der hochmolekularen Fraktion des Alkali-Extraktes folgen würde: Wie später gezeigt wird (Abb. 12), kommt es nach Röntgenbestrahlung sogar zu einem scheinbaren Anstieg der spezifischen Radioaktivität der DNS in dieser Fraktion, während die selektive Bestimmung der DNS völlig andere Resultate ergab. Es ist also zur spezifischen Erfassung der Radioaktivität in der DNS unbedingt die DNase-Behandlung erforderlich.

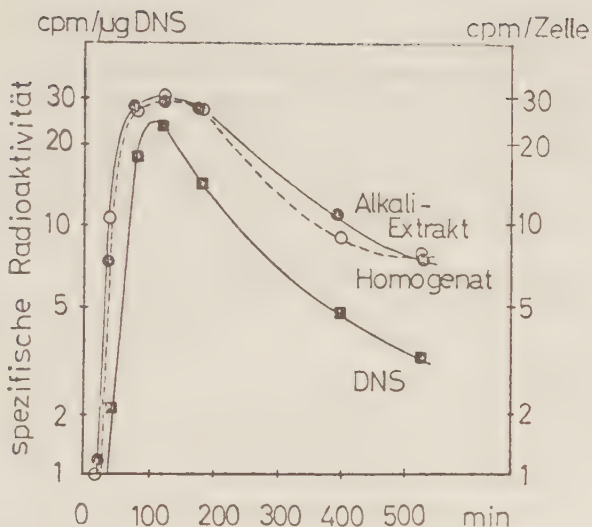


Abb. 11: Spezifische Radioaktivitäten der säureunlöslichen Fraktion des Homogenats, des Alkali-Extrakts und der DNS nach DNase-Abbau, in Abhängigkeit von der Zeit nach Zugabe von ^3H -Adenosin.

Die radioaktive Markierung wurde unter Standardbedingungen vorgenommen (s. Methodik, 10). Während des Einbaues wurden zu den verschiedenen Zeiten Proben mit ca 4×10^3 Zellen abgenommen und wie unter "Methodik, 12" beschrieben, die drei Fraktionen Homogenat, Alkali-Extrakt und DNase-abgebaute DNS-Bruchstücke gewonnen und DNS-Gehalt und Radioaktivität bestimmt.

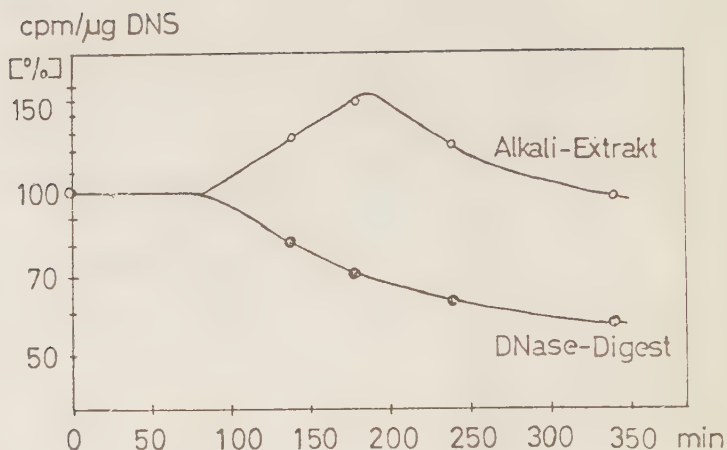


Abb. 12: Vergleich der spezifischen Radioaktivität der DNS im Alkali-Extrakt und im DNase-Digest (Röntgenbestrahlte Zellen).

Die Zellen wurden nach dem Standardansatz radioaktiv markiert (s. Methodik, 10), mit 100 KR bestrahlt und anschließend unter Wachstumsbedingungen inkubiert. Zu den verschiedenen Zeiten wurden Proben mit jeweils zwischen 1 und $1,5 \times 10^5$ Zellen abgenommen und, wie in 1,2 beschrieben, fraktioniert und jeweils DNS-Gehalt sowie Radioaktivität bestimmt.

Daß durch die DNase-Behandlung wirklich spezifisch die DNS erfaßt wird, läßt sich folgendermaßen zeigen:

- a) Alle im Ansatz enthaltene DNS wird vollständig durch DNase abgebaut. Dies gilt auch für extreme Situationen, wie sie etwa nach Bestrahlung auftreten (vgl. Tab. 4).
- b) Die durch DNase-Behandlung freigesetzten A_{260} -Einheiten entsprechen der Menge an DNS, die durch Bestimmung mit DPA gemessen wird. Sie ist jeweils gleich der eingesetzten DNS im Sofortstop. Es wird also kein zusätzliches, UV-absorbierendes Material freigesetzt (Tab. 5).
- c) Der entscheidende Test für die Brauchbarkeit der Methode ist aber eine kinetische Analyse des DNase-Abbaues. Wie Abb. 13 vermittelt, ergibt sich eine gleichbleibende spezifische Radioaktivität über den ganzen Inkubationsbereich hinweg. Das bedeutet, daß kein zusätzliches radioaktives Material säurelöslich wird und daß jede Einzelmessung reproduzierbare Werte liefert.

Es steht somit eine Methode zur Verfügung, die prinzipiell anwendbar ist auf Markierungen der DNS mit allen Nucleinsäurebausteinen, und welche es erlaubt, die spezifische Radioaktivität der DNS zu bestimmen und ihre Veränderungen zu verfolgen. Sie erfordert relativ wenig Aufwand und ermöglicht so serienmäßige Untersuchungen. Dadurch können wichtige biologische Vorgänge in vivo verfolgt werden wie z.B. DNS-Synthese im Zellzyklus durch Messung ihrer "Halbwertszeit" (in logarithmisch wachsenden Kulturen sollte die "Halbwertszeit" markierter DNS der Generationszeit entsprechen unter der Voraussetzung, daß eine Verdopplung der DNS-Menge aus nicht-markierten Vorstufen stattfindet (s.S.30 und Diskussion) und Re-utilisierung von Nucleinsäurebausteinen sowie Reparaturvorgänge.

Versuch Nr.		DNS-GEHALT (μ g DNS)		
		Homogenat	Alkali- Extrakt	durch DNase abgebaut
1	-	105	72	70
2	-	112	79	75
3	-	147	105	-
3	35 KR	135	84	-
4	-	140	81	87
4	100 KR	121	40	38
5	-	147	91	93
5	100 KR	147	41	41

Tab. 4: Abbau der DNS durch DNase

Die Bestimmungen in den einzelnen Versuchen wurden durchgeführt mit nach den Standardbedingungen radioaktiv markierten, wie unter Kapitel 1,2 angegeben fraktionierten Zellen. Die angegebenen Werte sind jeweils bezogen auf 1×10^9 Z.
Im Homogenat und im Alkali-Extrakt wurde die DNS nach Säurefällung mit TCE mit Hilfe der DPA-Reaktion nach BURTON bestimmt, nach DNase-Behandlung durch Messung von A_{260} .

Experiment Nr.	DNS-GEHALT (μg)		
	DNS ohne DNase DPA-Reaktion	säurelöslich nach DNase A_{260}	DPA-Reaktion
1	50,8	51,7	51,7
2	37,4	34,5	37,0
3	69,4	69,8	63,6
4	41,9	39,3	37,4

Tab. 5: Parallele Freisetzung von A_{260} -Einheiten und DPA-positivem Material bei der DNase-Behandlung.

Für diese Messungen wurde Zellmaterial eingesetzt, das in größeren Mengen durch Alkali-Extraktion, anschließende Säurefällung und Neutralisation des Niederschlages gewonnen wurde. Aliquote Teile von jeweils 0,36 ml wurden jeweils in einen DNase-Ansatz (vgl. Methodik, 8) eingesetzt. Die angegebenen Werte sind im DNase-Sofortstop durch die DPA-Reaktion, nach DNase-Behandlung im Säureüberstand parallel durch die DPA-Reaktion und durch Bestimmung von A_{260} gemessen worden (s. Kapitel 1,2).

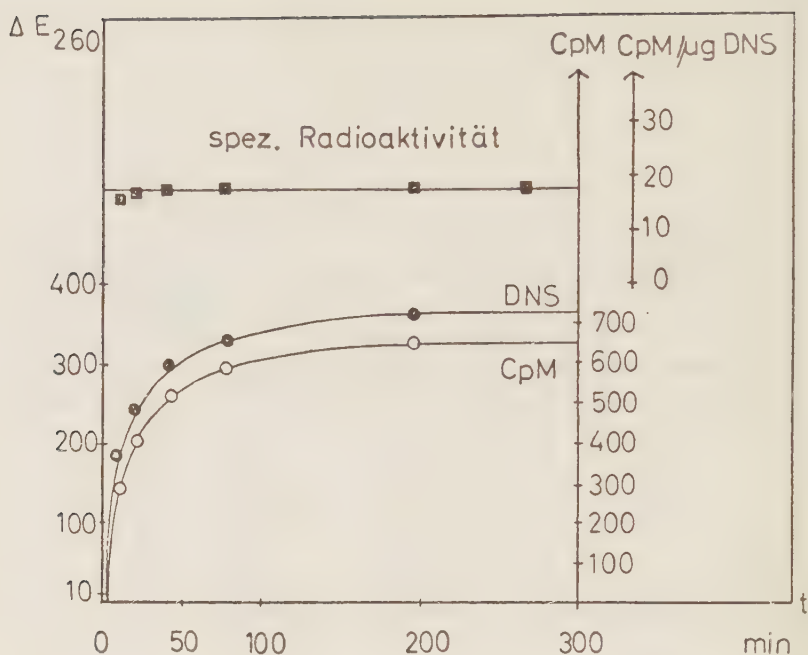


Abb. 13: Kinetik der DNase-Reaktion und spezifische Radioaktivität der DNS.

Die in die DNase-Reaktion eingesetzte Zellfraktion wurde wie folgt präpariert: Zellen, die radioaktiv markiert und bei -20°C aufbewahrt worden waren, wurden durch Kochen aufgeschlossen, mit TCE gefällt und der Niederschlag nach einer Äthanolwäsche alkalisch extrahiert. Der Alkali-Extrakt gewonnen aus 50×10^9 Zellen, hatte ein Volumen von 75 ml. Mit HCl wurde bei pH 5,0 ein großer Teil der Proteine ausgefällt. Das übrige hochmolekulare Material wurde mit TCE gefällt, der Niederschlag 2 mal mit TCE gewaschen, mit KOH neutralisiert und in Lösung gebracht mit einem Volumen von 3,7 ml.

Dieses war das ursprüngliche Verfahren, eine möglichst saubere DNS-Fraktion für die DNase-Behandlung zu gewinnen. Es stellte sich aber heraus, daß die Säurefällung im Homogenat und die pH 5 Fällung im Alkali-Extrakt nicht notwendig waren.

In den DNase-Ansatz wurde ein Aliquot des gelösten, auf pH 7,4 gebrachten Niederschlages aus dem Alkali-Extrakt von 2,5 ml mit 0,2 ml DNase (1mg/ml) eingesetzt. Zu den verschiedenen Zeiten wurden jeweils Aliquots von 0,3 ml entnommen und mit 0,2 ml 10 % PCS versetzt. Im Überstand wurden Radioaktivität und A_{260} der säurelöslich gewordenen DNS-Bruchstücke bestimmt.

2. Aufnahme und Einbau von ^3H -Adenosin in logarithmisch wachsende Hefezellen.

Bei Markierungsversuchen, welche den decay der Radioaktivität aus Makromolekülen ermitteln wollen, sind folgende Punkte zu beachten:

Aufnahme und Einbau von Präkursoren erfolgen über einen Nucleotid-Pool, in den gegebenenfalls endogene Syntheserouten einmünden:

Während anfänglich der Einbau in Makromoleküle praktisch nur von der Syntheserate bestimmt wird, kommt allmählich immer mehr auch der turnover von (bereits markierten) Makromolekülen ins Spiel. Nach dem Aufhören weiterer Zufuhr von radioaktiven Vorstufen wird der Präkursor-pool nur noch gespeist von abgebauten Makromolekülen. Es kommt dann entscheidend darauf an, ob zwischen Pool und Außenmedium ein Austausch besteht, oder ob die in der Zelle durch Abbau etwa von RNS-Molekülen entstandenen Nucleotide und Basen quantitativ wieder für Synthesen verwandt werden. Wenn letzteres der Fall ist, dann sollte die gesamte Radioaktivität pro Kultur konstant bleiben. Die Markierung würde dann allmählich aus den metabolisch instabilen Makromolekülen wie mRNA verschwinden und über den Pool in metabolisch stabile Makromoleküle (DNS, ribosomale RNS, tRNA) verschoben werden. Da gleichzeitig Wachstum und Zellteilung weiterlaufen, würde die vorhandene Radioaktivität in den stabilen Molekülen auf immer mehr Zellen verteilt, d.h. die Radioaktivität/Zelle würde abnehmen. Aber erst dann, wenn diese steady state Bedingungen erreicht sind, also alle Radioaktivität in den stabilen Molekülen gebunden ist, wird die "Halbwertszeit" der DNS der Generationszeit

entsprechen. Liegt keine vollständige Reutilisation vor, sondern daneben noch Austausch mit dem Medium, so beeinflusst dies vor allem die Geschwindigkeit, mit der die spezifische Radioaktivität des Pools sinkt. Die Gesamtradioaktivität der Kultur nimmt unter diesen Bedingungen ebenfalls ab. Weniger betroffen ist die "decay rate" der stabilen Makromoleküle. Da sehr bald der Pool frei ist von Radioaktivität, bringt die Neusynthese z.B. von DNS nur nicht-markierte Verbindungen (in einer Generationszeit die gleiche Menge wie vorhanden), so daß unter diesen Bedingungen früher als im Fall vorher die Abklingrate der spezifischen Radioaktivität der Generationszeit entspricht.

Das bedeutet, daß in Zellen mit extensiver Reutilisierung von RNS-Bausteinen in den ersten Generationen nach Absetzen des radioaktiven Präkursors die Abklingrate der DNS langsamer sein wird als die Zunahme der DNS-Menge.

Aufnahme und Einbau von Adenin

Adenin wird von Hefen nahezu unbegrenzt aufgenommen (COWIS und BOLTON⁸). Versuche von CUMMINS und MITCHISON⁹ sowie WINTER⁸⁴ und REICHERT und WINTER⁸⁵ deuten daraufhin, daß für die Aufnahme ein spezielles Transportsystem existiert, und die Anhäufung bestimmter Poolkomponenten bedeutende Faktoren für die Regulation der Aufnahme von Adenin in die Zelle sind. Bei verstärktem Adenin-Angebot konnten diese Autoren erhebliche Volumenvergrößerungen des säurelöslichen Pools, insbesondere die Akkumulation von Inosin nachweisen. Wir haben den Einbau von ³H-Adenin-Tracer in hochmolekulares Material in niedriger Konzentration verglichen mit dem Einbau bei höherer Adenin-

Konzentration. Es zeigte sich, daß unter unseren Bedingungen kein verstärkter Übergang der Radioaktivität in die Nucleinsäurefraktion zu erzielen (Abb. 14).

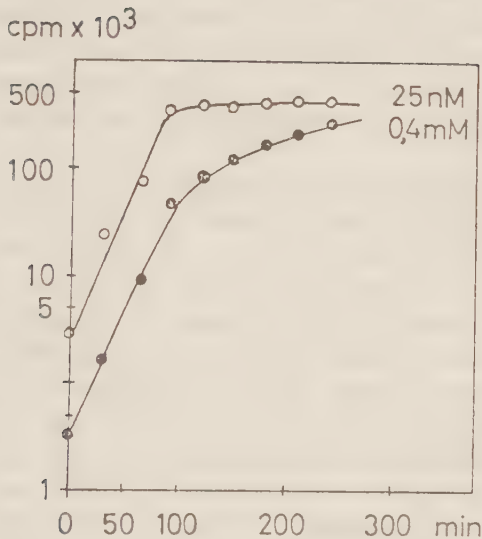


Abb. 14: Einbau von ^3H -Adenin bei verschiedenen Adeninkonzentrationen.

Der Suspensionskultur (250 ml) mit 1×10^9 Zellen wurde ^3H -Adenin (50 μCi , 6 Ci/mMol) mit einer Endkonzentration von 25,4 nM zugegeben. Einer Parallelkultur wurde zusätzlich Adenin zu einer Endkonzentration von 0,1 mM (spezifische Radioaktivität = 0,4 mCi/mMol) zugesetzt.

Radioaktive Markierung mit Adenosin

Hefezellen nehmen exogenes ^3H -Adenosin ebenso gut auf wie Adenin. Bietet man den Kulturen im Wachstumsmedium ^3H -Adenosin an in einer Konzentration von $2 \times 10^{-8}\text{M}$, so erfolgt ein rascher Einbau in säureunlösliches Zellmaterial (Abb. 15). Schon innerhalb einer Zellverdopplung nach 90 min befindet sich hier der größte Teil der Radioaktivität in der hochmolekularen Zellfraktion. Die säureunlösliche Radioaktivität pro Zelle ist dann am höchsten. Bei weiterem Zellwachstum wird zunächst noch weiter Radioaktivität eingebaut bis ein gewisses Niveau erreicht wird. Auch nach längerer Wachstumszeit bleibt die insgesamt im hochmolekularen Zellmaterial vorhandene Radioaktivität konstant, was auf eine Reutilisation in großem Umfang schließen läßt und einen starken Austausch mit dem Medium ausschließt.

In der einzelnen Zelle verdünnt sich die spezifische Radioaktivität entsprechend der Wachstumsrate, vermindert um die zusätzlich eingebaute Radioaktivität, die entweder aus dem Medium oder aus dem Nucleotidpool in den Zellen stammt. Vergleicht man die spezifische Radioaktivität in der gesamten hochmolekularen Zellfraktion und nach DNase-Abbau in der DNS, so stellt sich heraus, daß die Radioaktivität in der DNS nicht so schnell und nicht so stark zunimmt wie in den gesamten Nucleinsäuren und schneller wieder sinkt (Abb. 16). Der Peak für die spezifische Radioaktivität in der DNS ist schmaler. Dennoch sinkt dieser Parameter etwas langsamer als der DNS-Gehalt zunimmt. Also auch in die DNS wird noch weiter Radioaktivität aufgenommen.

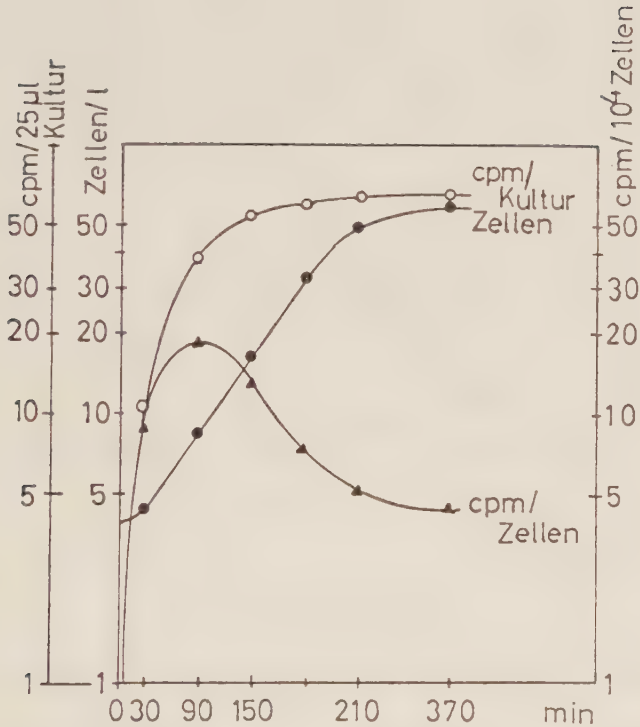


Abb. 15: ^3H -Adenosin-Einbau in die säureunlösliche Fraktion.

Der Suspensionskultur (11) wurde ^3H -Adenosin (200 μCi) zugegeben bei einer Zellanfangskonzentration von 4×10^5 Zellen/l. Zu den verschiedenen Zeiten nach Zugabe der Radioaktivität wurden der Kultur je 0,5 ml entnommen und nach Säurefällung und Hydrolyse mit TCE die in den verschiedenen Zeitabständen in das säureunlösliche Zellmaterial eingebaute Radioaktivität gemessen.

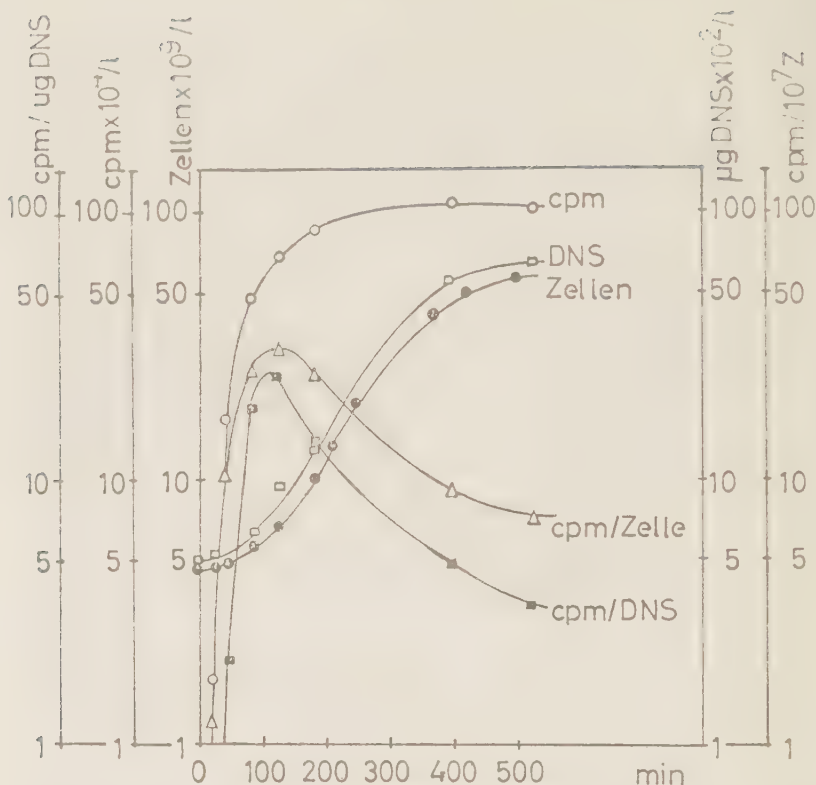


Abb. 16: ^3H -Adenosin-Einbau in das säureunlösliche Zellmaterial und in die DNS.

Der Inkubationsansatz war 3 l WM, 12×10^9 Zellen, 600 μCi ^3H -Adenosin. Zu den verschiedenen Zeiten nach Start der Inkubation wurden ca. 2×10^9 Zellen entnommen, durch Kochen aufgeschlossen und mit TCE ausgefällt. In einem Aliquot, das 2×10^8 entspricht, wurden nach Hydrolyse mit TCE DNS mit der DPA-Reaktion nach BURTON und ins säureunlösliche eingebaute Radioaktivität bestimmt.

Nach dem Schema von Abb. 15 wurde der Niederschlag gewaschen, alkalisch extrahiert, mit TCE, ohne pH 5 Fällung, wieder ausgefällt und mit NaOH in Lösung gebracht und neutralisiert.

Der DNase-Ansatz enthielt den gelösten, neutralisierten Niederschlag, 0,1 ml PO_4^{3-} -Puffer 0,5 M, MgSO_4 0,05 M und DNase 0,2 ml (mg/ml) bei einem Gesamtvolumen von 1,05 ml. Die Inkubationszeit war 150 min. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 % PCS gestoppt und im Säureüberstand die Radioaktivität und der DNS-Gehalt durch Messung von A_{260} bestimmt.

Wechselt man nach dem Einbau von ^3H -Adenosin zum Zeitpunkt der maximalen spezifischen Radioaktivität das Medium und läßt die Zellen ohne exogene Radioaktivität weiterwachsen, so ist eine weitere Aufnahme von ^3H -Adenosin aus dem Medium ausgeschlossen. Im Verlaufe der Inkubation nimmt jedoch die in der hochmolekularen Fraktion gebundene Radioaktivität zunächst weiter zu, die offensichtlich aus dem säurelöslichen Nucleotidpool stammt (Abb. 17).

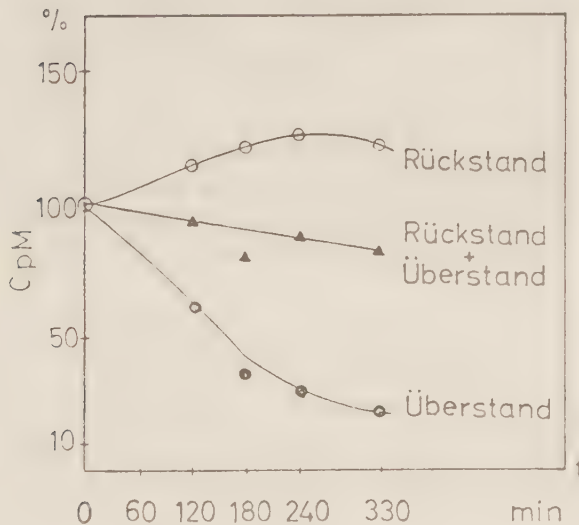


Abb. 17: Verteilung der Radioaktivität in mit ^3H -Adenosin markierten Zellen nach Inkubation in nicht radioaktivem Medium auf die hoch- und die niedermolekulare Zellfraktion.

Nach Vormarkieren der Zellen nach dem Standardansatz (s. Methodik) wurden sie in nicht radioaktivem WM inkubiert. Zu den verschiedenen Zeiten wurden der Kultur Proben entnommen und nach Aufschluß der Zellen durch Kochen die hochmolekularen Zellbestandteile mit 2 % PCS ausgefällt. Im Überstand und im Niederschlag wurde die Radioaktivität gemessen. Die Summe ergibt die insgesamt in den Zellen enthaltene Radioaktivität.

Das bedeutet, daß die Zellen nicht alle vorhandenen radioaktiven Vorstufen aus dem Nucleotidpool für die Synthese von säureunlöslichem Material verwenden, sondern daß ein Teil ins Außenmedium abgegeben wird.

Analysiert man DNS-Gehalt und spezifische Radioaktivität der DNS, so zeigt sich (Abb. 18), daß die Rate der DNS-Vermehrung größer ist als die Rate, mit der die Geschwindigkeit der spezifischen Radioaktivität absinkt. Unter den gleichen Bedingungen nimmt die spezifische Radioaktivität des Nucleotidpools etwas schneller ab. Die Diskrepanz zwischen Zunahme der DNS und Abfall der spezifischen Radioaktivität erklärt sich aus einer beträchtlichen Reutilisierung der Nucleotide, die aus dem Abbau metabolisch instabiler Nucleinsäuren stammen. Dennoch ergibt sich eine eindeutige Beziehung zwischen Wachstum und Veränderung der spezifischen Radioaktivität der DNS (Die Vermehrung der DNS um den Faktor 5 ergibt eine Verminderung der spezifischen Radioaktivität der DNS um den Faktor 3; vgl. Abb. 18).

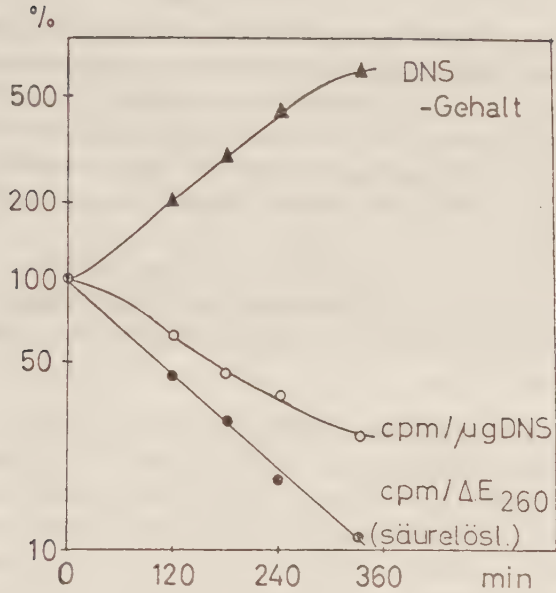


Abb. 18: Vergleich der Veränderungen der spezifischen Radioaktivität von DNS und säurelöslichem Pool während der DNS-Synthese

Die Zellen sind nach dem Standardansatz (s. Methodik) vormarkiert und werden in nicht radioaktivem Medium kultiviert. In den verschiedenen Zeitabständen nach Start der Kultur werden DNS-Gehalt und spezifische Radioaktivität gemessen wie beschrieben (Methodik, Abb. 17)

3. In-vivo-Bestimmungen von Reparaturvorgängen an der DNS nach Röntgenbestrahlung.

Während bei UV Bestrahlung an der DNS in der Hauptsache Basenveränderungen stattfinden, insbesondere Pyrimidin-dimerisierungen (BENKERS und BERENDS³), was den effektiven Schaden für die Überlebensrate setzt (WACKER et al⁷¹, SETLOW und SETLOW⁶⁴), werden durch ionisierende Strahlen folgende Schäden hervorgerufen (WEINERT und HAGEN⁷²):

- a) Einzel- oder Doppelstrangbrüche,
- b) intra- oder intermolekulare Vernetzungen,
- c) strahlenchemische Veränderungen oder Eliminierung von Basen.

Bei den Einzelstrangbrüchen wurde eine lineare Strahlen-dosisabhängigkeit gefunden (HARTWIG²⁶). Unter den an den Basen gesetzten Schäden sind vorzugsweise Pyrimidin-Basen, vor allem Thymin, betroffen, entweder durch Energie- oder wahrscheinlich Radikal-Transfer von einer DNS-Konstituenten zur anderen (GREGOLI et al¹⁸, HARIHARAN, CERUTTI²⁴).

Bisher sind für diese Schäden 4 verschiedene Reparatur-mechanismen untersucht worden (PAINTER⁵⁴):

- a) Photoreaktivierung von Thymindimeren nach UV-
Bestrahlung,
- b) Verknüpfung von Einzelstrangbrüchen,
- c) Excisionsreparatur in Form von Repair-Replication,
- d) Rekombinationsrepair.

3.1 Zellwachstum nach Bestrahlung

Hefezellen, die nach Bestrahlung nicht mehr Koloniebildungsfähig sind, schließen unter unseren Wachstumsbedingungen noch eine bereits initiierte Zellteilung ab und teilen sich dann nicht mehr. Da die Synthese von Zellmasse, Proteinen, RNS und auch DNS trotzdem fortgesetzt wird, bilden sich Riesenzellen aus, die paarweise zusammenhängen, da die letzte Knospe jeweils nicht mehr abgelöst wird (HILZ und ECKSTEIN²⁸, TAKAMORI et al⁶⁸). Es findet also nach Bestrahlung noch maximal eine Verdopplung der Zellzahl statt, während die Kontrollzellen logarithmisch mit einer Generationszeit von ca. 100 min wachsen (Abb. 19).

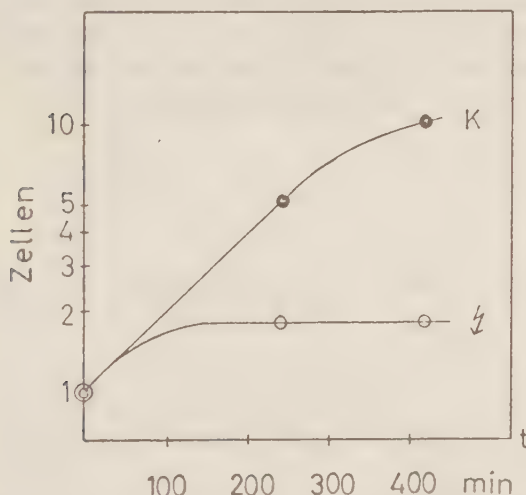


Abb. 19: Zellwachstum nach Röntgenbestrahlung

Die Zellen wurden unter den in "Methodik" genannten Bedingungen vorkultiviert, die Hälfte der Zellen bestrahlt mit 100 KR, und Kontroll- und bestrahlte Zellen unter Wachstumsbedingungen kultiviert bei einer Anfangskonzentration von 8×10^9 Zellen/l.

3.2 DNS-Syntheserate nach Bestrahlung

Bei synchronisierten Hefezellen, die nach Bestrahlung unter Wachstumsbedingungen inkubiert werden, setzt die DNS-Synthese, im Gegensatz zu den anderen Zellinhaltsstoffen, erst nach einer Lag-Phase in reduziertem Maße wieder ein. Auch die zweite DNS-Synthese-Phase ist stark verzögert (ECKSTEIN¹⁴), (Abb. 20). Bei logarithmisch wachsender Hefe zeigt die DNS-Synthese ebenfalls eine Lag-Phase. JAMES und WERNER³² erreichten bei diploiden Hefezellen durch künstliche Verlängerung dieser Lag-Phase sowohl vor der ersten als auch zwischen der ersten und der zweiten Zellteilung nach Bestrahlung eine Erhöhung der Überlebensrate und zeigten damit einen Zusammenhang auf zwischen strahlenbedingter Lag-Phase und Reparaturvorgängen an der DNS in dieser Zeit, sowie der Möglichkeit, daß Schäden an der DNS über einen Replikationszyklus bestehen können.

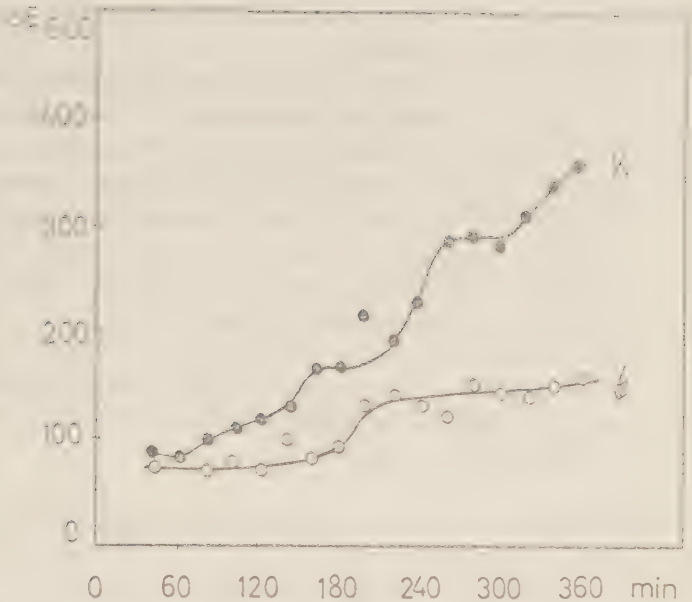


Abb. 20: DNS-Synthese in synchronisierten Zellen nach Röntgenbestrahlung.

Von einer Suspension synchronisierter Presshefe (s. Methodik, 5) wurde eine Hälfte mit 50 KR bestrahlt und anschließend Kontroll- und bestrahlte Zellen unter Wachstumsbedingungen inkubiert mit einer Anfangskonzentration von 5×10^9 Zellen/l. In Abständen von 20 min wurden der Kultur aliquote Teile entnommen und nach Säurefällung und Hydrolyse der Zellen mit TCE der DNS-Gehalt mit der DPA-Reaktion nach BURTON bestimmt.

3.1 Spezifische Radioaktivität der DNS während der Inkubation von bestrahlten, radioaktiv markierten Hefezellen.

Wie lassen sich in unserem System Reparaturvorgänge an der DNS feststellen ?

Es ist bekannt, daß nach Röntgenbestrahlung die Synthese der DNS für einen dosisabhängigen Zeitraum unterbunden wird. Findet Reparatur in der Form von "Excision Repair" statt, wie sie erstmalig bei E.coli von HOWARD-FLANDERS und BOYCE²⁹ und von HAYNES²⁷ festgestellt und mit Hilfe eines "cut and patch" und eines "patch and cut" Modells erklärt worden war, so muß ein Teil der DNS-Bausteine gegen neue ausgetauscht werden. Da in diesem Zeitraum die spezifische Radioaktivität des Pools weiter absinkt, wird die Repair-Synthese ein Absinken der spezifischen Radioaktivität der DNS bei gleichbleibender Konzentration/Kultur ergeben.

Mit unserer Methode der Erfassung der spezifischen Radioaktivität haben wir die Möglichkeit, während der Lag-Phase der DNS-Synthese nach Röntgenbestrahlung strahlenbedingten Turnover zu messen. Voraussetzung dafür ist, daß in dieser Zeit keine Zunahme des DNS-Gehaltes erfolgt. Dann bedeutet eine Änderung der spezifischen Radioaktivität tatsächlich Turnover in der DNS, und das bedeutet, Replikationsrepair durch Austausch von defekten Stücken.

Für diese Untersuchungen wurden die Zellen unter den in "Methodik" beschriebenen Bedingungen vor Bestrahlung mit ³H-Adenosin markiert. Dadurch konnten strahlenbedingte Effekte der Aufnahme und des Einbaues von Prä-

kursoren in die Zelle ausgeschlossen werden. Allerdings können Veränderungen in der Größe und im Turn-over des Nucleotidpools die spezifische Radioaktivität beeinflussen. Da jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen die Zunahme der säurelöslichen Nucleotide und das Sinken ihrer spezifischen Radioaktivität nicht wesentlich verändert sind (Abb. 21), und auch die Menge der in der säureunlöslichen Fraktion enthaltenen Radioaktivität keine signifikanten Abweichungen erkennen läßt (Abb. 22), sind die Voraussetzungen für eine zuverlässige Messung des DNS-Repairs gegeben.

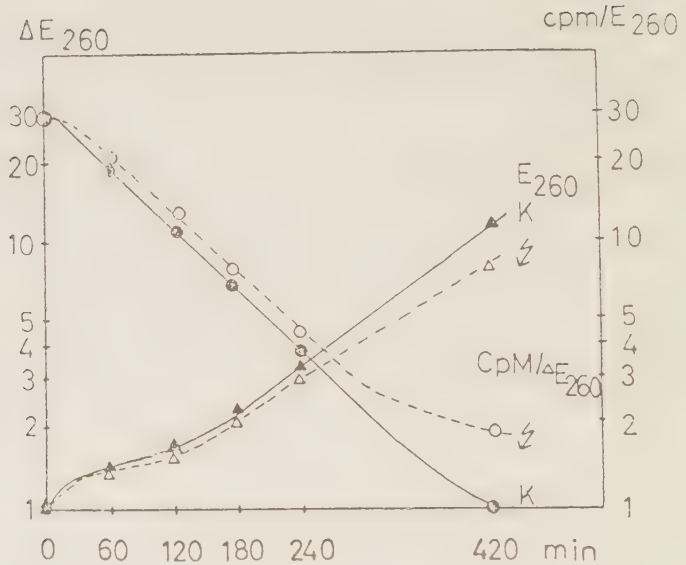


Abb. 21: Gehalt an A_{260} -Einheiten und spezifische Radioaktivität des säurelöslichen Pools nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen.

Die Zellen wurden radioaktiv markiert, bestrahlt mit einer Dosis von 100 KR und anschließend unter Wachstumsbedingungen, parallel zu unbestrahlten Kontrollzellen, inkubiert (vgl. Methodik, 7, 10, 11). In den verschiedenen Zeitabständen nach Inkubation werden den Kulturen Proben entnommen, die Zellen durch Kochen aufgeschlossen und nach Säurefällung mit 2 % PCS im Überstand A_{260} -Einheiten und Radioaktivität bestimmt (s. Methodik, 12).

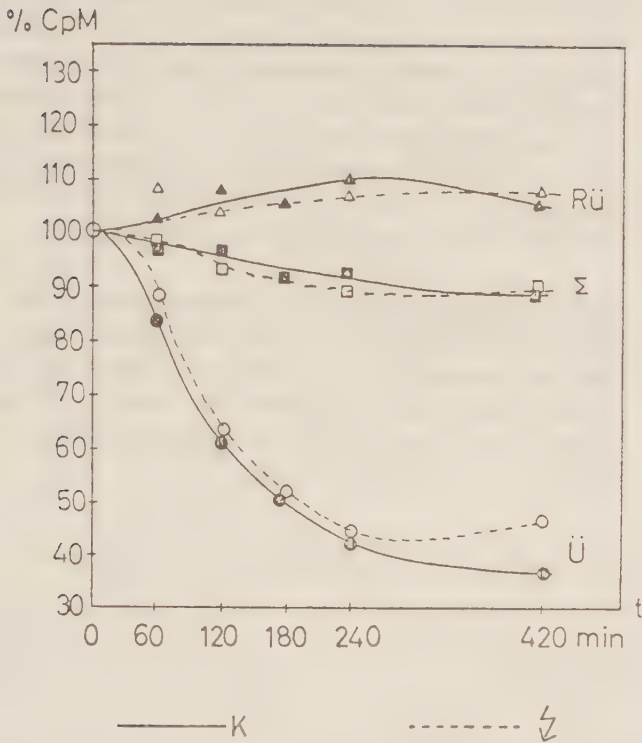


Abb. 22: Verteilung der Radioaktivität in bestrahlten und Kontrollzellen nach Markierung mit ^3H -Adenosin.

Die Zellen wurden nach den unter "Methodik" angegebenen Bedingungen radioaktiv markiert, eine Hälfte mit 100 KR bestrahlt und bestrahlte und Kontrollzellen in parallelen Ansätzen unter Wachstumsbedingungen inkubiert. Die Messungen wurden wie im Versuch bei Abb. 17 durchgeführt. Die insgesamt in den Zellen enthaltene Radioaktivität ist die Summe der in der hochmolekularen Fraktion, dem Säureniederschlag und der in der niedermolekularen Fraktion, dem Säureüberstand, enthaltenen Radioaktivität.

Bestimmt man unter diesen Bedingungen der Vormarkierung DNS-Gehalt und spezifische Radioaktivität der DNS im Verlauf der Inkubation (Abb. 23 und 24), so zeigt sich bei den Kontrollkulturen eine Zunahme der DNS-Menge und eine entsprechende Abnahme der spezifischen Radioaktivität (gleiche Raten). Im klaren Gegensatz dazu ist nach Bestrahlung mit 35 KR wie mit 100 KR eine vollständige Arretierung der DNS-Synthese zu beobachten, die von einem extensiven Abfall der spezifischen Radioaktivität begleitet ist.

Damit ist der Nachweis von Reparaturvorgängen an der DNS bestrahlter Kulturen aufgezeigt. Die Abhängigkeit von der Strahlendosis ergibt sich dabei aus dem frühzeitigeren - weil intensiveren - Austausch markierter gegen nicht -markierte DNS-Abschnitte (vgl. Abb. 23 und 24).

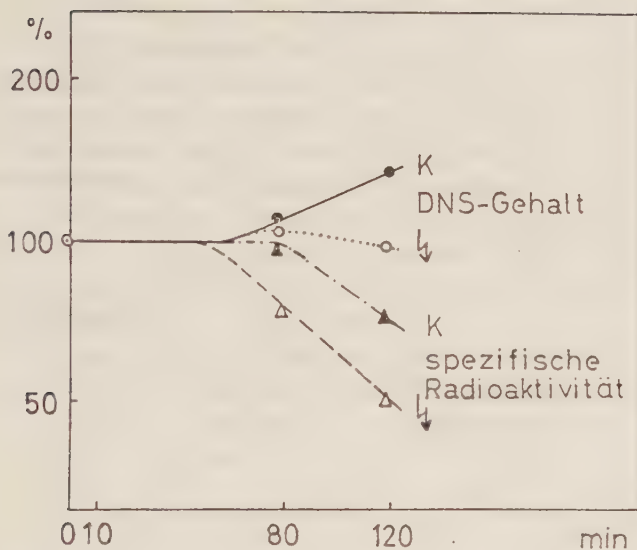


Abb. 23: DNS-Gehalt und spezifische Radioaktivität der DNS in röntgenbestrahlten (35 KR) Hefekulturen.

Hefezellen wurden, wie unter "Methodik" beschrieben, radioaktiv markiert, mit 35 KR bestrahlt und unter Wachstumsbedingungen, parallel mit unbestrahlten Kontrollzellen inkubiert. In den verschiedenen Zeitabständen nach Start der Inkubation werden der Kultur Proben mit jeweils ca. 2×10^7 Zellen entnommen und nach Aufarbeitung wie unter "Methodik, 12" beschrieben, im Zellhomogenat der DNS-Gehalt mit der DPA-Reaktion nach BURTON und nach DNase-Behandlung die spezifische Radioaktivität der DNS bestimmt.

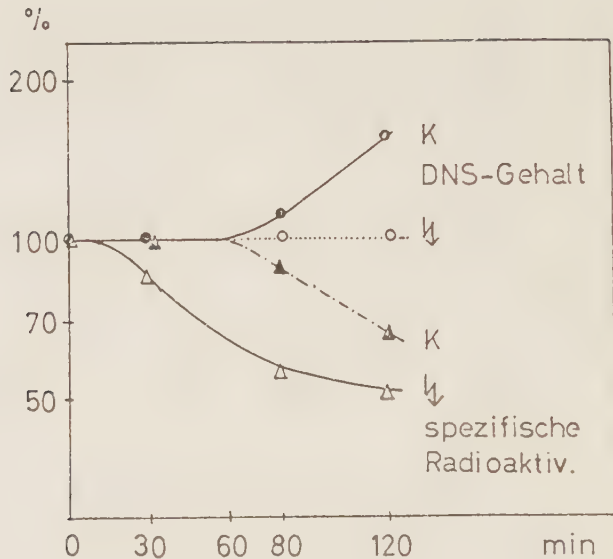


Abb. 24: DNS-Gehalt und spezifische Radioaktivität der DNS in röntgenbestrahlten (100 KR) Hefekulturen.

Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie unter Abb. 23 beschrieben. Die Bestrahlungsdosis war hier 100 KR.

DISKUSSION

Mit Hilfe der spezifischen Erfassung der DNS durch Abbau mit DNase kann man auch in Hefezellen die Untersuchungen vornehmen, die bei anderen Zellen durch Markierung mit Thymin gemessen werden, was bisher nicht möglich war. Sie ist etwas aufwendiger als die Messung des Thymin-Einbaues, aber dennoch wesentlich einfacher und schneller als die chemische Isolierung der DNS, frei von interferierenden Verunreinigungen.

Da es nur auf die spezifische Radioaktivität der DNS ankommt, spielt ein gewisser Verlust an DNS, wie er bei der Alkali-Extraktion zu verzeichnen ist (vgl. Tab. 4), keine Rolle.

Welche Ursache freilich für die relativ niedrige Ausbeute an DNS bei der Alkali-Extraktion verantwortlich ist, muß offen bleiben. Interessanterweise ist die Ausbeute nach Bestrahlung noch geringer. Dies ist sicher nicht durch die Bildung sehr kurzer (säurelöslicher) DNS-Stücke bedingt, da der Verlust im Hogenat nicht auftritt. Eher ist er auf Quervernetzungen mit Kernproteinen unter Bildung unlöslicher Aggregate zurückzuführen.

Nimmt man den Einbau von exogenen Präkursoren als Maß für die Nucleinsäuresynthese, so ist der Einfluß des säurelöslichen Pools mit seiner eventuell veränderlichen Größe, Turnoverrate und somit Beeinflussung der endogenen Synthese zu beachten. Durch das Angebot etwa von exogenem Adenin können auch in der Verteilung der übrigen Nucleotide erhebliche Veränderungen (z.B. Inhibierung der de-novo-Synthese von AMP und GMP)

stattfinden (BEKKER et al¹). Unter den hier beschriebenen steady-state-Bedingungen einer logarithmisch wachsenden Kultur ist jedoch keine Störung durch exogene Faktoren zu erwarten, sofern diese in tracer-Konzentrationen angewandt werden.

Nach Behandlung der Zellen mit chemischen Agentien oder Strahlen müssen jedoch eventuelle, hierdurch bedingte Veränderungen in der Aufnahme in die Zelle und im säurelöslichen Pool beachtet werden. Im umgekehrten Falle ist diese Gefahr nicht gegeben, da ja durchmarkierte Kulturen in einem normalen Wachstumsmedium inkubiert werden, aber der Einfluß des Turnovers im Nucleotidpool auf die spezifische Radioaktivität der Nucleinsäuren bleibt bestehen. Wie die Kurven in den Abb. 16 und 18 zeigen, findet offensichtlich eine gewisse Reutilisation der Nucleotide statt, die aus dem Abbau metabolisch instabiler Nucleinsäuren (mRNA) stammen. Dadurch sinkt die spezifische Radioaktivität des Präkursor-Pools nicht so schnell ab und die neusynthetisierten Makromoleküle sind in entsprechendem Maße radioaktiv, obgleich die Kultur in kaltem Medium wächst. So ist es verständlich, daß nach dem Transfer der Kulturen in kaltes Medium die Radioaktivität im hochmolekularen Material nach Markierung noch leicht zunimmt, während die säurelöslichen Bestandteile rasch absinken. Ein geringer Teil der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität wird an das Medium abgegeben (Abb. 17).

Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von COWIE und BOLTON⁸ an *Candida utilis*, die keine Abnahme der Radioaktivität in den Zellen nach Markierung mit C¹⁴ Adenin feststellen konnten. Die Radioaktivität

wurde vollständig in die Nucleinsäuren eingebaut.

Einen Einfluß auf die nach Vormarkierung mit Adenosin resultierende spezifische Radioaktivität der DNS haben eventuell auch Nucleinsäurefraktionen mit hohem Adenin-Anteil oder andere hochpolymere adeninhaltige Fraktionen, deren Anteil und Einfluß auf den Turnover sich je nach Stoffwechselsituation, besonders also nach chemischer oder Strahlenbehandlung der Zellen stark ändern könnte. Diese Parameter scheinen jedoch in unserem System keine große Rolle zu spielen, da der Abfall der säurelöslichen Radioaktivität durch Bestrahlung der Zellen nur unwesentlich verändert wird (vgl. Abb. 21).

Für die Annahme, daß Hefezellen Strahlenschäden teilweise kompensieren können, gibt es mehrere Hinweise: Die Dosiseffektkurven für die Überlebensrate, gemessen an der Koloniebildungsfähigkeit, ist eine "Schultertypkurve": Bis zu einer "kritischen Dosis" wird der Strahlenschaden fast vollständig kompensiert, bei höheren Dosen nimmt die Überlebensrate exponentiell ab (Abb. 25). Sowohl die Höhe dieser "kritischen Dosis" als auch die Steilheit des exponentiellen Abfalles sind Ploidiegrad-abhängig. Am resistantesten sind diploide und triploide Stämme, bei höherem Ploidiegrad nimmt die Strahlensensibilität wieder zu, und bei haploiden Zellen zeigt die DEK überhaupt keine Schulter, sie können Strahlenschäden kaum kompensieren, die Kurve fällt sofort exponentiell ab (JANNSEN et al.³⁴). Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß haploide Zellen keine Reparaturmechanismen besitzen wie di- oder triploide Zellen (POHLIT⁵⁶, JAMES,

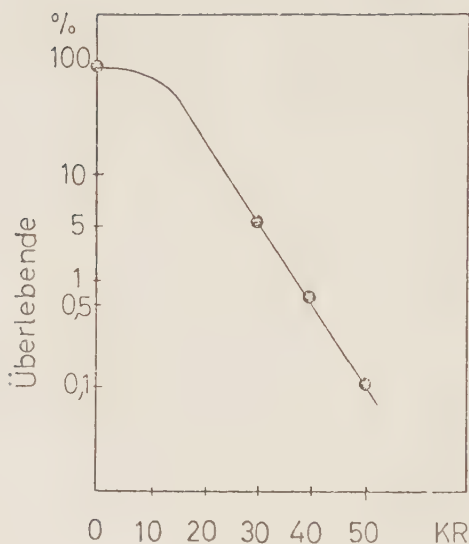


Abb. 25: Dosiseffektkurve für die Überlebensrate nach Röntgenbestrahlung.

Die Zellen wurden unter den in "Methodik" angegebenen Bedingungen vorkultiviert und bestrahlt während verschiedener Zeiten entsprechend den angegebenen Dosen. Anschließend wurden sie auf Nähragar inkubiert und nach zwei Tagen die Zellkolonien ausgezählt.

WERNER³², PAINTER, RASMUSSEN⁸²).

Die Reduktion der DNS-Syntheserate ist ebenfalls Ploidiegrad-abhängig (JANNSEN et al³⁴).

Bei der Reparatur der Schäden an der DNS werden offensichtlich nicht nur die defekten Stücke der DNS herausgeschnitten und ersetzt, sondern die Repair-replikation erfolgt in mehr oder weniger langen "Läufen" (PAINTER et al⁵⁵, KAPLAN et al³⁸). Auch Einzelstrangbrüche nach Röntgenbestrahlung werden anscheinend nicht einfach geschlossen, sondern auch hier werden längere DNS-Stücke herausgeschnitten und ersetzt (STRAND⁵⁷).

Aufgrund dieser Kenntnisse schien es sinnvoll, in unserer triploiden Hefe nach Röntgenbestrahlung nach Reparaturvorgängen durch Austausch von DNS-Bausteinen zu suchen.

Eine klassische Methode zur Messung von Replikations-repair ist die Bestimmung von nicht semikonservativer DNS-Synthese mit Hilfe von kombinierter Dichte- und Radioaktivitätsmarkierung durch 5-Br-desoxy-Uridin und anschließende CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (HANAWALT²¹, HANAWALT und COOPER²²). Gegenüber der von uns angewandten Methode hat sie den Vorteil, daß für die Messung nicht die vollständige Hemmung der DNS-Synthese erforderlich ist. Allerdings sind quantitative Aussagen auch hier schlecht möglich, da 5-Br-dU selektiv etwas langsamer als Thymin eingebaut wird. Bei Hefen ist dieses Verfahren jedoch grundsätzlich nicht anwendbar, weil 5-Br-dU, wie auch Thymin, nicht in die Zellen eingebaut wird.

Replikationsrepair sollte aber auch durch die Ermessung der hierdurch bedingten Veränderung der spezifischen Radioaktivität der DNS feststellbar und deshalb mit Hilfe der hier entwickelten Methode meßbar sein. Im säurelöslichen Pool findet nach Bestrahlung keine wesentliche Änderung der Größe (A_{260}) und der Radioaktivität (cpm) gegenüber der Kontrolle statt. Die Abnahme der spezifischen Radioaktivität der DNS zu einem Zeitpunkt, da keine Zunahme des DNS-Gehaltes erfolgt, muß daher durch Reparaturvorgänge erklärt werden, welche mit dem Ersatz heißer Nucleotidsequenzen durch kalte (oder kältere) einhergehen und nicht etwa die direkte Verknüpfung der durch die Röntgenbestrahlung entstandenen Einzelstrangbrüche beinhalten.

Von mehreren Autoren werden zwei unterschiedliche Repairsysteme postuliert, ein "rapid repair system" zur schnellen Reparatur von Strangbrüchen und ein anderes zum Austausch von geschädigten DNS-Stücken in Form von Repair-Replication (DRIEDGER und GRAYSON¹⁰). Diese These wird gestützt durch die Existenz von "extrem sensitiven" Mutanten von Hefe, *E.coli* und *Micrococcus radiodurans*, denen das eine oder das andere Repairsystem oder beide fehlen (NAKAI, MATSUMOTO, KILIAN et al²⁰, BROWN, KELLEY⁵). Selbst Mutanten, die kein Repairsystem besitzen, sind offensichtlich noch in der Lage, durch Crossover-Austausch Strahlenschäden zu kompensieren (RUPP et al⁶¹).

Unsere Methode erlaubt naturgemäß nicht, das "rapid repair system" oder crossover-Vorgänge zu erfassen, da dabei die spezifische Radioaktivität nicht veränderbar wird. Freilich dürften diese Vorgänge bei höheren

Strahlendosen auch nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Inwieweit Vorgänge an nicht nuclearer DNS das Meßergebnis beeinflussen, ist unsicher. Immerhin beträgt in Hefe der Anteil der Mitochondrien-DNS etwa 15 - 20 % (WILLIAMSON und MOUSTACCHI⁷⁵, FUKUHARA¹⁶, CORNEO et al⁷).

Die hier dargestellte Methode schafft die Voraussetzungen dafür, bei synchronisierten Hefezellen in der Zeit der zweiten DNS-Synthese-Verzögerung durch eine kinetische Analyse der spezifischen Radioaktivität der DNS eine vermutete "Postreplication-repair" aufzuspüren, die noch über die erste DNS-Replikation hinweg in Form von "gaps" bestehende DNS-Schäden dann erst repariert (vgl. JAMES und WERNER³², RUPP und HOWARD-FLANDERS⁵⁹, KLIMEK, VANICEK⁴⁰, RUPP et al⁶⁰, THEILE⁶⁹).

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Hefezellen ist, im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen, eine spezifische Markierung der DNS mit Hilfe von exogen angebotenen Thymin oder Thymidin nicht möglich. Es wurde deshalb eine Methode erarbeitet, die die selektive Erfassung der DNS auch nach unspezifischer Markierung ermöglicht. Die wesentlichen Schritte sind alkalische Degradierung der RNS und spezifische Hydrolyse der DNS mittels DNase. Diese Methode vermeidet langwierige chemische Trennverfahren von DNS und RNS, ist ohne viel Aufwand in kleinen Ansätzen durchführbar und eignet sich somit für Serienversuche.

Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, daß in ^3H -Adenosin-markierten logarithmisch wachsenden Kulturen eine beträchtliche "Reutilisierung" von Nucleinsäurebausteinen stattfindet, so daß der Abfall der spezifischen Radioaktivität der DNS um ca. den Faktor 2 langsamer erfolgt als dem Nettozuwachs an DNS entspricht.

Die Applikation der erarbeiteten Methode auf röntgenbestrahlte Kulturen erbrachte den Nachweis einer dosisabhängigen Repair-Replikation, die sich gegenüber den Kontrollen als ein starker Abfall der spezifischen Radioaktivität der DNS bei vollständiger Arretierung der Netto-DNS-Synthese (bei synchronisierten wie auch asynchronen Kulturen) darstellt. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, daß die Markierung des säurelöslichen Nucleotidpools in Kontrollen und bestrahlten Zellen nicht wesentlich voneinander abweicht.

Es steht hiermit eine Methode zur Verfügung, die prinzipiell auf alle Markierungen der DNS mit beliebigen Nucleinsäure-Bausteinen anwendbar ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BEKKER, S., K.LUCHINKA, E.SMOLINA; Biokhimiya 1971, 36 (5) 895
- 2 BEN HUR, E., R.BEN ISHAI; Photochem.Photobiol. 1971, 13 (4) 337
- 3 BENKERS, R. and W.BERENDS; BiochimBiophys.Acta, 41, 350 (1960)
- 4 BRENDEN M. et al.; Anal.Biochem. 18, 147 (1967)
- 5 BROWN, A.M., B.J.KILLEY; Mol.Gen.Genet. 108 (1970) 258
- 6 BURTON, K.; Biochem. J. 62, 315 (1956)
- 7 CORNEO, G., C.MOORE, D.R.SANADI, L.I.GROSSMANN, J.MARMUR; Science 151 (1966) 687
- 8 COWIE, D.B., E.T.BOLTON; Biochim.Biophys.Acta 25 (1957) 292
- 9 CUMMINGS, J.E., J.M.MITCHISON; Biochim.Biophys.Acta, 136 (1967) 108
- 10 DISCHE, Z., in: The Nucleic Acids (ed E.CHARGAFF and J.W.DAVIDSON) Vol.1,p.285, Academic Press, New York
- 11 DOUDNEY, C.O.; Ultraviolet Light Effects on DNA Replication; in: Cellular Radiation Biology, Williams and Wilkins, Baltimore, Md, 1965, pp 120-138
- 12 DOUDNEY, C.O.; Mutat.Res. 12 (1971) 121
- 13 DRIEDGER, J., T.GRAYSTON; Can.J.Microbiol. 1971, 17 (4) 4
- 14 ECKSTEIN, H.; Z.Naturforsch. 26b (12) 1971
- 15 FALKOW, S., H.ZIMMELMAN and J.S.BURK; J. of Biological Compounds, Vol. VI (1) 1970, 76
- 16 FUKUHARA, H.; Europ.J.Biochem. 11 (1969) 135
- 17 GREEN, P., C.GRAY, F.MURDEN, W.BRIDGES; Mol.Gen.Genet. 1971, 112 (2) 110
- 18 GREGOLI, A., L.TAVERNA, P.RIVALDI; Cron.chim. 1970, 18-24

- 19 GRIVELL, D.R. and J.F.JACKSON; J.gen.Microbiol. (1968) 54,
307
- 20 GUERINEAU, J., P.GRANDCHAMP, D.PAVLETTI, P.SLOWINSKI;
Biochim.Biophys.Res.Comm. 1971, 42 (3) 550
- 21 HANAWALT, P.C.; US At.Energy Comm. 1970, SU-326-P-7-x-22
- 22 HANAWALT, P.C.,P.K.COOPER; Methods of Enzymology, 1971
21, edit. by COLOWICK and KAPLAN
- 23 HAND, S., H.TAMM; J.Virol. 1971, 8 (4) 597
- 24 HARIHARAN, D., P.CERUTTI; Nature (London) New Biol. 1971,
229 (8) 247
- 25 HARRIS, G. and G.E.NEAL; Biochim.Biophys.Acta 43 (1960) 197
- 26 HARTWIG, S.; Stud.biophys. 1971, 21 (1) 29
- 27 HAYNES, R.H.; Radiat.Res.Suppl. 6,8 (1966)
- 28 HILZ, H. und H.ECKSTEIN; Biochem.Z. 340, 351 (1964)
- 29 HOWARD-FLANDERS, P. and R.P.BOYCE; Radiation Res.Suppl.
6, 156 (1966)
- 30 HUDNIK-PLEVNIK, C., R.G.DJARDJEYIK; Stud.biophys. 1970,
20, 17
- 31 HUTCHISON, W.C. and H.N.MUNROE; The Analyst 1961 86, 763
- 32 JAMES, C. and J.WERNER; Can.J.Genet.Cytol. 1969, 11 (4)
848
- 33 JANNSEN, S., W.LASKOWSKI, E.-R.LOCHMANN; Z.Naturforsch.
24b (10) 1969
- 34 JANNSEN, S., E.-R.LOCHMANN, W.LASKOWSKI; Z.Naturforsch.
23b (11) 1968 1500
- 35 JANNSEN, S. und E.-R.LOCHMANN; FEBS Letters, Vol. 8,
113 (1970)
- 36 KAPP, D.S. und K.C.SMITH; Int.J.Radiat.Biol. 14 (1968) 567
- 37 KAPP, D.S. und K.C.SMITH; Int.J.Radiat.Biol. 19 (1971) 255
- 38 KAPLAN, J.C., S.R.KUSHNER, L.GROSSMANN; Biochemistry 10 (18)
3315

- 39 KHAN, H., M.BRENDEL, R.H.HAYNES; Molec.Gen.Genet. 107 (1970) 375
- 40 KLIMEK, M., R.VANICEK; Math.Biosci. 1970, 9, 165
- 41 KUSHNER, S.R., J.C.KAPLAN, H.DUO, L.GROSSMANN; Biochemistry Vol. 10, No 18, 1971, 3325
- 42 LASKOWSKI, W.; Z.Naturforsch. 15b, 495 (1960)
- 43 LASKOWSKI, W., E.-R.LOCHMANN, A.WACKER und W.STEIN; Z.Naturforsch. 15b 730 (1960)
- 44 LEHMANN, S., R.OMEROD; Biochim Biophys.Acta, 217 (1970) 2
- 45 LOCHMANN, E.-R.; Naturwiss. (1965) 52, 489
- 46 LUSENA, L.V.; Canad.J.Chem. 29 (1951) 107
- 48 MARMUR, J.J.; J.Mol.Biol. 3 (1961) 208
- 49 McGRATH, R.A. and R.W.WILLIAMS; Nature 212 (1966) 534
- 50 MEIJIS, W.H., R.A.SCHILPERPOORT; FEBS Letters, Vol. 12 (3) 1971
- 51 MESELSON, M. and F.W.STAHL; The Replication of DNA in E. coli, Proc.Natl.Acad.Sci.(US) 44 (1958) 671
- 52 NAKAI, S., S. MATSUMOTO; Mutat.Res. 94 (1967) 571
- 53 OGUR, M., G. ROSEN; Arch.Biochem. 1950, 25, 262
- 54 PAINTER, R.B.; Time-dose Relat.Radiat.Biol.Appl.Radiother. IRI-AES Conf. 1969 (pub. 1970) 14-26
- 55 PAINTER, R.B., J.S.UMBER, B.R.YOUNG; Radiat.Res. 44, 133-145 (1970)
- 56 POHLIT, W.; Advanc.Biol.Med.Phys. 1968, 12, 275
- 57 POHLMANN K., H.SCHRATT; Z.Naturforsch. 1961, 10b, 673
- 58 ROBERTS, D., J.PASCOC, H.SMITH, W.CRATHORN; Chem.Biol. Interactions 1971, 3(1) 4968
- 59 RUPP, W.D. and P.HOWARD-FLANDERS; J.Mol.Biol. 31 (1968)
- 60 RUPP, W.D., J.DEAN and P.HOWARD-FLANDERS; Methods of Enzymology 1971, 21, 237

- 61 RUPP, W.D., O.WILDE, P.RENO, P.HOWARD-FLANDERS; J.Mol.Biol.
1971, 61 (1) 25-44
- 62 SCHMITT, S., K.TANNHAUSER; J.Biol.Chem. 161 (1945) 83
- 63 SCHNEIDER, W.C.; Meth.Enzymol. 3, 660 (1957)
- 64 SETLOW, R.B. and J.K.SETLOW; Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 48,
1250 (1962)
- 65 SETLOW, R.B. and W.C.CARRIER; Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 51,
226 (1964)
- 66 SMETS, L.A., H.BROHEE; Stud.Biophys. 1962, 12, 109
- 67 STREFFER, C.; Strahlen-Biochemie, Berlin-Heidelberg-New York,
Springer, 1969
- 68 TAKAMORI, W., E.-R.LOCHMANN, W.LASKOWSKI; Z.Naturforsch.
21b, 960 (1966)
- 69 THEILE, M.; Stud.Biophys. 1970, 21-22, 367
- 70 TOWN, J., O.SMITH, R.KAPLAN; Science 1971, 197, 851
- 71 WACKER, A., H.DELLWEG and D.JACHERES; J.Mol.Biol. 4, 410
(1962)
- 72 WEINERT, H. und U.HAGEN; Strahlentherapie 136, 204 (1962)
- 73 WICKERHAM, L.J.; Taxonomy of YEASTS, Techn.Bull.No 1029
Dep.Agricult.Washington 1951
- 74 WILLIAMSON, D.H.; Biochem. J. 90, 25P (1962)
- 75 WILLIAMSON, D.H., E.MOUSTACCHI; Biochem.Biophys.Res.Comm.
42 (1971) 195
- 76 WILLIAMSON, D.H., E.MOUSTACCHI, D.FENNEL; BiochimBiophys.
Acta 238 (1971) 369
- 77 WHEAT, J.; Methods of Enzymologie 8, 60 (1965)
- 78 WILLIAMS, R., M.MITCHELL, J.Bact. 100 (1969) 443
- 79 EDDY, S., D.H.WILLIAMSON; Nature 179, 1252 (1957)
- 83 SCHNEIDER, E.; Berlin, persönl.Mitteilung
- 84 WINTER, M.; Dissertation, F.U.Berlin 1972

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit vom Wintersemester 1970/71 bis zum Sommersemester 1972 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof.Dr.HILZ durchgeführt.

Herrn Prof. HILZ bin ich für die Betreuung der Arbeit und vielfältig gewährte Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. ECKSTEIN danke ich für die Überlassung des Themas.

LEBENSLAUF

Am 10. April 1947 wurde ich als Tochter des
Drogisten Hanns KOLL und seiner Frau Erika, geb.
LINNERT, in Aachen geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Grundschule
in Würselen/Aachen, anschließend bis 1966 das
Heussprachliche Mädchengymnasium mit Latein-Zug
i.E., St. Ursula, in Aachen. Nach dem Abitur
wurde ich zum Sommersemester 1966 an der Natur-
wissenschaftlichen Fakultät der Freien Uni-
versität Berlin immatrikuliert. Hier lernte ich
zum Sommersemester 1968 die Diplom-Vorprüfung
für das Fach Biologie ab.

Im Sommersemester 1968 wechselte ich an die
Universität Hamburg und begann im Physikalisch-
Chemischen Institut mit den Arbeiten für meine
Dissertation.

Seit Dezember 1971 bin ich mit dem Kaufmann
Kunihiko YAMAGUCHI verheiratet.

REPROGRAFIE-ZENTRUM

Lüdke bei der Uni 44 62 17 / 44 71 72
Schlüterstraße 50-54

Lüdke bei der Börse 36 47 25
Hopfenmarkt 33

Alsterdruck
Hehnholt 59

641 41 86

